



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

**Alteraciones de la función plaquetaria en la cirrosis
biliar experimental: Homeostasis del calcio
intracelular**

Paola Alejandra Romecín Durán

2014



Este trabajo está dedicado a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy. También se lo dedico a mis queridos hermanos (Lenny y Marcelo) y a mi cuñado Sergio. Por todo el cariño y cuidado que me han dado siempre esta es una pequeña muestra de lo importantes que son para mí.



AGRADECIMIENTOS

*Quiero que mi palabra, sea limpia y sencilla
Como limpia ha de ser toda buena semilla;
Que sirve poner en el surco simiente,
depurada con esfuerzo paciente.*

Este trabajo ha sido todo un descubrimiento, en muchos sentidos de mi vida, es la prueba escrita de que el poder de la intensión hace posible los sueños de cualquier persona. Para que haya podido hacer esta tesis ha sido una sincronía de eventos y causalidades. La primera persona que me dio la oportunidad de hacer lo que me gusta es Joaquín García Estañ, me pareció sorprendentemente extraño que sin haberme conocido me haya dado la confianza de trabajar en el laboratorio y poder usar todo el material que necesitara para poder formarme, pero debo decir que esta tesis no es solo mía sino también de mi tutora Noemí Marín, con ella aprendí no solo los protocolos, sino también los detalles y la delicadeza que tiene que tener la investigación, admiro su pasión por ella y su gran capacidad y energía para poder hacer sus sueños realidad, su constancia y tesón siempre me van a inspirar a seguir adelante.

Pero, varias personas han sido mis maestras y Clara Ortiz es una de ellas, quien conoce a Cler (que así le digo de cariño) saben lo eficiente y super-competente y sobre todo muy CLARA. Por todo eso y su apoyo y orientación que me ha brindado le estoy muy agradecida por haber contribuido en mi formación.

Como olvidar a mi querido David Iyu, para mí el mejor amigo y confidente que puedo tener, el ayudarme a sacar adelante protocolos aun estando en Inglaterra, y siempre dispuesto a echarme una mano, sobre todo nunca olvidaré que gracias a él pude hacer mi estancia en Amsterdam, siempre ha estado a mi lado en esos momentos en que más lo he necesitado, para todos lo que le conocen, saben que es un ángel como persona y me siento orgullosa de saber que soy su amiga.

Durante los años del doctorado hemos sido varios tesistas, no olvido a mi querida Toñi que fue la primera en darme una gran sonrisa siempre que entraba al laboratorio y

junto con mi querida Esther, hicieron que mis primeros pasos en el labo hayan sido más llevaderos. A José Eduardo, compañero y amigo de lucha en la investigación, y a su esposa Haydee, de los cuales no solo admiro la bondad y dulzura que desprenden, tienen cualidades infinitas de las que me hace estar orgullosa de ser su amiga y sé que el cariño que nos tenemos es mutuo, solo espero que el destino no nos separe para que así podamos seguir compartiendo buenos momentos. En estos últimos años, también la vida me ha dado la oportunidad de conocer a dos amigas maravillosas, Rasha y Susana, que a pesar de provenir las tres, de nacionalidades diferentes, compartimos muchas cosas en común, y puedo decir con seguridad que entre nosotras hay una sincera e incondicional amistad.

De manera también muy especial quiero agradecer a mi hermana Lenny, que es coautora de este trabajo, porque todos los dibujos han pasado por sus manos para adaptarlos y ponerlos en un formato homogéneo, y siempre a gusto del cliente (o sea yo), gracias por aguantarme hermana!!!!!!

Podría terminar diciendo en prosa y verso lo importantes que son para mí, pero mi capacidad literaria no es tan dulce, pero si puedo concluir con el corazón en la mano que he llegado a descubrir que cada persona que se ha cruzado en mi camino ha sido un reflejo de lo que soy o quiero llegar a ser, aunque al principio me costó asimilar dicha premisa, la vida me ha demostrado que nunca se le escapan los detalles, todos ellos para que puedas aprender, para así poder mejorar y avanzar; así puedo decir que la vida consiste de esos pequeños detalles, a veces sutiles a veces grandes. Doy gracias a la vida por haberme permitido trabajar con personas nobles que siempre que lo he necesitado me han dado su mano y me han orientado en esos momentos claves, no solo a nivel académico, sino también personal. Aunque mis palabras no lleguen a expresar toda la gratitud que siento, y aunque no lleguen a expresar todo el cariño que os tengo, solo quiero darles las GRACIAS!!!!!! Por todos esos buenos momentos de alegría y contento y porque la amistad que me han dado amigos y tutores, ya hacen que todo haya valido la pena.

En fin..... GRACIAS por caminar junto mí.



PUBLICACIONES

Comunicaciones a Congreso:

Romecín PA, Paredes MD, Ortiz AJ, Ortiz Ruiz E, Meseguer AB, Millán J, García EM, Atucha, NM, García-Estañ J, Ortiz MC. Crosstalk between RAS/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in the increased NFκB expression of cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) from cirrhotic rats. Revista: XIV Congreso de la *Sociedad Española de Biología Celular (SEBC)*
Páginas: P0083 Fecha: 12/2011

Romecín PA, J.E Millán, AB Meseguer, MC Ortiz, F Gragnolini, EM García, N Atucha, J García-Estañ. Increased platelets reactive oxygen species (ROS) production in experimental cirrosis. *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia-Spain.*
Revista: *Journal of Hepatology*
Volumen: 52, N°1 Páginas: S213-S214 Fecha: 04/2010

Romecín PA, J.E Millán, F Gragnolini, E García, C Ortiz, N Atucha, J García-Estañ. Role of homocysteine in the platelet function of bile duct ligated rats. *Physiology, Universidad de Murcia- Spain*
Revista: *Journal of Hepatology.*
Volumen: 50, N°1 Páginas: S280 Fecha: 04/2009

Romecín PA, Meseguer AB, Millán JE, Ortiz MC, Cragolini F, García E, Atucha NM, García-Estañ J. Increased platelets reactive oxygen species (ROS) production in experimental cirrosis. *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia-Spain.*
Ref. Revista: XIII Congreso de la *Sociedad Española de Biología Celular (SEBC)*
Volumen: 50, N°1 Páginas: S280 Fecha: 04/2009

Meseguer AB, **Romecín PA**, Millán JE, Ortiz MC, Cragolini F, García E, Atucha NM, García-Estañ. Effects of folic acid treatment on platelet alterations of bile duct ligated rats. *Departamento de Fisiología, facultad de Medicina, Universidad de Murcia-Spain.*
Revista: XIII Congreso de la *Sociedad Española de Biología Celular (SEBC)*
Páginas: 199 Fecha: 12/2009

Atucha N, Ortiz AJ, Ortiz E, **Romecín PA**, Millan JE, Meseguer AB, García EM, García-Estañ J, Ortiz MC. Altered Brown and RAS/ERK1/2 Signaling in primary cultured vascular smooth muscle cells from cirrhotic rats. *Departamento de Fisiología, facultad de Medicina, Universidad de Murcia-Spain.*
Revista: XIII Congreso de la *Sociedad Española de Biología Celular (SEBC)*.
Páginas: 199 Fecha: 12/2009

Romecín PA, Millán JE, Meseguer AB, Ortiz MC, Cragolini F, García E, Atucha NM, García-Estañ. Efecto de la homocisteina y del ácido fólico en la función plaquetaria de ratas con ligadura del conducto biliar. *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, 30100 Murcia, España.*
Revista: XXXV Congreso de la *Asociación Española para el estudio del Hígado (AEEH)*
Páginas: 148 Fecha: 12/2009

Artículos en proceso de publicación:

“Role of Homocysteine and Bile Acid on the altered calcium homeostasis in platelets in an animal model of Biliar Cirrhosis”

“Role of Folic Acid on the altered calcium homeostasis and function in platelets from an animal model of Biliar Cirrhosis”

“Role of NO and ROS on the altered calcium homeostasis in platelets in an animal model of biliar cirrhosis”

Estancia realizada:

Beca otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia de España, para la realización de una estancia de tres meses en el ***Academical Medical Center de la Universidad de Amsterdam-Holanda***, en el laboratorio de *“Química Clínica Experimental”* para la obtención del título de DOCTOR (TM2009-00280) (2010).



ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
---------------------------	---

RESUMEN	III
----------------------	-----

I. INTRODUCCIÓN

1. *PLAQUETAS*

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	1
1.2 ESTRUCTURA PLAQUETARIA.....	2
1.2.1 MEMBRANA PLAQUETARIA.....	3
1.2.1.1 Moléculas de adhesión	4
a. Glicoproteínas	4
b. Receptores no glicoproteicos	7
1.2.2 SISTEMA DE MEMBRANAS INTERNO	9
1.2.2.1 Sistema canicular abierto (SCA)	9
1.2.2.2 Sistema tubular denso (STD)	9
1.2.3 CITOESQUELETO PLAQUETARIO	9
1.2.4 GRÁNULOS ESPECÍFICOS	9
1.2.4.1 Gránulos α	10
1.2.4.2 Gránulos densos.	10
1.2.4.3 Lisosomas.....	11
1.3 FUNCIÓN PLAQUETARIA	11
1.3.1 HEMOSTASIA PRIMARIA.....	11
1.3.1.1 Cambio de forma.....	12
1.3.1.2 Adhesión plaquetaria.....	12
1.3.1.3 Agregación plaquetaria	13
1.3.1.4 Secreción plaquetaria.	16
1.3.2 HEMOSTASIA SECUNDARIA	16
1.3.2.1 Coagulación de la sangre.	16
1.3.3 RETRACCIÓN DEL COÁGULO Y FIBRINÓLISIS	21

2. EL IÓN Ca^{2+}

2.1	MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+}	22
2.1.1	ALMACENES DE Ca^{2+} PLAQUETARIO	23
2.1.2	MECANISMOS QUE PRODUCEN UN AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN CITOPASMÁTICA DE Ca^{2+}	24
2.1.2.1	Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares	24
2.1.2.2	Entrada de Ca^{2+} desde el exterior.....	25
2.1.2.3	Entrada capacitativa del Ca^{2+} (ECC)	26
2.1.3	MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE CALCIO DEL CITOPLASMA CELULAR.....	28
2.1.3.1	Recaptación de la SERCA	28
2.1.3.2	Eliminación de Ca^{2+} al medio extracelular	29
2.1.3.3	Recaptación de Ca^{2+} por la mitocondria.....	29
2.1.3.4	Recaptación de calcio por la proteínas.....	30
2.2	HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN LAS PLAQUETAS	30

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

3.1	TIPOS DE ROS	32
3.2	GENERACIÓN <i>in vivo</i> DE ROS.....	34
3.3	DEFENSAS CELULARES CONTRA LAS ROS.....	35
3.4	EFEECTO SOBRE LOS COMPONENTES CELULARES	37
3.5	ROS y PLAQUETAS.....	37
3.5.1	ROS DERIVADO DE LAS PLAQUETAS.....	38

4. CIRROSIS HEPÁTICA

4.1	GENERALIDADES	41
4.2	MODELOS EXPERIMENTALES DE LA CIRROSIS	42
4.3	CIRROSIS BILIAR.....	43
4.3.1	ALTERACIONES EN EL FLUJO SANGUÍNEO.....	44
4.3.2	DAÑO OXIDATIVO.....	45



4.4	FISIOPATOGENIA DE LA HEMOSTASIA EN LA CIRROSIS	46
4.4.1	DEFECTOS DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINÓLISIS	49
4.4.1.1	Deficit de factores de la coagulación	49
4.4.1.2	Coagulación intravascular diseminada y fibrinólisis acelerada	49
4.4.1.3	Hipercoagulación.....	50
4.4.1.4	Hiperfibrinólisis.....	51
4.4.1.5	Disfibrinogemia.....	51
4.4.2	DISFUNCIÓN PLAQUETARIA.....	51
4.4.2.1	Trombocitopenia.....	51
4.4.2.2	Alteraciones intrínsecas de las plaquetas	52
4.4.3	INSUFICIENCIA RENAL.....	55
4.4.4	INFECCIONES.....	56
4.4.5	CITOQUINAS Y CIRROSIS.....	56
4.4.6	OXIDO NÍTRICO (NO).....	58
4.4.7	HOMOCISTEÍNA (Hcy)	59
4.4.7.1	Vía de remetilación	60
4.4.7.2	Vía de transulfuración.....	61
4.4.8	HIPERHOMOCISTEINEMIA (HHcy) EN LA CIRROSIS HEPÁTICA	62
4.4.8.1	Patogenia de la HHcy	63
a.	Disfunción endotelial.....	63
b.	Alteraciones en la coagulación	65
II.	PLANTEAMIENTO	69
III.	OBJETIVOS	71
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	
1.	ANIMALES DE ESTUDIO.....	73
1.1	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	73
2.	LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR (LCB).....	74
3.	ENSAYOS EXPERIMENTALES	75
3.1	<i>ENSAYO 1</i>	75
3.1.1	AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	75

3.1.1.1	Principios del ensayo.....	75
3.1.2	PROTOCOLO.....	78
3.2	<i>ENSAYO 2</i>	79
3.2.1	MEDICIÓN DEL Ca ²⁺ INTRACELULAR CON FURA 2-AM.....	79
3.2.1.1	Principios del ensayo.....	79
3.2.2	PROTOCOLO.....	81
3.2.3	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DEL Ca ²⁺	83
3.2.4	EFFECTO AGUDO DE FACTORES PLASMÁTICOS SOBRE LAS PLAQUETAS.....	87
3.3	<i>ENSAYO 3</i>	88
3.3.1	MEDICIÓN INTRACELULAR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) CON CM-H ₂ DCFDA-acetil ester.....	88
3.3.1.1	Principios del ensayo.....	88
3.3.2	PROTOCOLO.....	88
3.3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DE ROS.....	89
3.4	<i>ENSAYO 4</i>	91
3.4.1	MEDICIÓN DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	91
3.4.1.1	Principios del ensayo.....	91
3.4.2	PROTOCOLO.....	94
3.5	<i>ENSAYO 5</i>	96
3.5.1	MEDICIÓN DE HCY TOTAL EN EL PLASMA.....	96
3.5.1.1	Principios del ensayo	96
3.5.2	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	96
4.	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	97

V. RESULTADOS

1.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	99
2.	ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA CIRROSIS HEPÁTICA BILIAR.....	100
2.1	MEDICIÓN DE LA AGREGACION PLAQUETARIA	100
2.2	MEDICIÓN DE LA EXPRESION DE LA P-selectina.....	101
3.	ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INTRÍNSECAS	103
3.1.	MEDICIÓN DEL Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	103
3.1.1	NIVELES BASALES DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	103
3.1.2	LIBERACION DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	103
3.1.3	ENTRADA DE Ca ²⁺ EXTRACELULAR.....	105



3.1.4	NIVELES TOTALES DE Ca ²⁺ PLAQUETARIO	106
3.1.5	ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca ²⁺ (ECC)	107
3.1.6	ECC CON REGISTRO DE UNA TERCERA LONGITUD DE ONDA	110
3.1.7	PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO)	111
3.1.7.1	Respuesta a L-NAME crónico (1 mg/Kg/día)	111
3.1.7.2	Disminucion de la disponibilidad de NO con BSO	115
3.2	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	122
3.2.1	EN RESPUESTA A H ₂ O ₂ , Trombina y ADP.....	122
4.	ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS FACTORES PLASMÁTICOS (factores extrínsecos)	124
4.1	EFECTO AGUDO DE LAS CITOQUINAS Y DE LA BSO: sobre la expresion de P- selectina.....	124
4.2	EFECTO AGUDO DE LOS ÁCIDOS BILIARES	125
4.2.1	MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA P-selectina.....	125
4.2.2	MEDICIÓN DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	126
4.3	EFECTO AGUDO DE LA HCY	133
4.3.1	NIVELES PLASMÁTICOS DE HCY.....	133
4.3.2	EFECTO AGUDO DE LA HCY EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA ...	133
4.3.3	MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P-selectina	135
4.3.4	MEDICIÓN DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	136
4.3.5	PRODUCCIÓN DE ROS	140
5.	EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ÁCIDO FÓLICO.....	141
5.1	MEDICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA	141
5.2	MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P-selectina	143
5.3	MEDICIÓN DEL Ca ²⁺ INTRACELULAR	145
5.4	PRODUCCIÓN DE ROS.....	149
VI.	SUMARIO DE RESULTADOS.....	151
VII.	DISCUSIONES	155
VIII.	CONCLUSIONES.....	173
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	175
X.	ANEXOS.....	205

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS DE RESULTADOS

Tabla 1: Valores del peso corporal y del bazo, en animales control, LCB de 15, 21 días y con ascitis. Sin y con tratamiento crónico con ácido fólico	99
Tabla 2: Agregación Plaquetaria en respuesta a ADP (5 μ M), expresada en %, en el Área y Agregación Máxima, en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 15, 21 días y con ascitis.....	101
Tabla 3: Valores de expresión de P-selectina, en unidades arbitrarias (UA), en animales control y con ligadura del conducto biliar de 21 días y con ascitis	102
Tabla 4: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Liberación de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la Tr y ADP en plaquetas de animales control, LCB 21 días y con ascitis.	104
Tabla 5: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la trombina y ADP en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis.	106
Tabla 6: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca^{2+} intracelular en respuesta a TG + Ionomicina en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis	107
Tabla 7: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) Entrada Capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la TG y TBHQ y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en animales control y LCB de 21 días y con Ascitis	109
Tabla 8: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca^{2+} en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis	111
Tabla 9: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Liberación de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la trombina en plaquetas de animales control y LCB 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME.....	112
Tabla 10: Valores del área bajo la curva (expresado en (nM) de los niveles totales de Ca^{2+} en respuesta a TG + Ionomicina, en animales control y LCB 21 días.	114
Tabla 11: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la TG y TBHQ y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en ratas control y LCB de 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME	115
Tabla 12: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca^{2+} en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis tratadas agudamente con BSO (5 mM).....	116



Tabla 13: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca ²⁺ intracelular en respuesta a la Tr (0,3 U/ml) en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con Ascitis, tratadas agudamente con BSO.....	117
Tabla 14: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca ²⁺ liberado en respuesta a TG + Ionomicina, en plaquetas de animales control, LCB 21 días y ascitis, tratadas agudamente con BSO	118
Tabla 15: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ intracelular en respuesta a TG y tras la adición de Ca ²⁺ extracelular en plaquetas tratadas agudamente con BSO, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis.....	120
Tabla 16: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ intracelular en respuesta a TBHQ y tras la adición de Ca ²⁺ extracelular en plaquetas tratadas agudamente con BSO, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis	121
Tabla 17: Valores del área bajo la curva (expresado en UA) de los niveles de ROS en respuesta a H ₂ O ₂ , trombina y ADP en animales control, LCB de 21 días y con ascitis..	123
Tabla 18: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en respuesta a ADP (5 µM), en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con IL-6 y TNF-α	124
Tabla 19: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en respuesta a ADP (5 µM), en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con BSO.....	125
Tabla 20: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en controles, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	126
Tabla 21: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca ²⁺ intracelular en animales control, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	127
Tabla 22: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca ²⁺ intracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	128
Tabla 23: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca ²⁺ extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	129
Tabla 24: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa (A) en respuesta a TG y (B) en respuesta a Ca ²⁺ extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	131

Tabla 25: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	132
Tabla 26: Valores del Área de Agregación con respecto al control, expresado en %. En animales control y con LCB de 15, 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con Hcy.....	134
Tabla 27: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en controles y con LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con Hcy.....	135
Tabla 28: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca ²⁺ intracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo Hcy	136
Tabla 29: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada de Ca ²⁺ extracelular en respuesta a Tr (0,3 U/ml), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo Hcy	138
Tabla 30: Valores del área bajo la curva (expresado en UA) de los niveles de ROS en respuesta a Hcy en animales control, LCB de 21 días y con ascitis	140
Tabla 31: Valores de agregación plaquetaria, expresada en %, para el Área y Agregación Máxima. En animales control y con LCB de 15, 21 días y con ascitis, tratadas crónicamente con ácido fólico	142
Tabla 32: Efecto del tratamiento del Ácido Fólico, expresado en % de descenso en el Área de Agregación. En controles y con LCB de 15, 21 días y con ascitis	142
Tabla 33: Valores de expresión de P-selectina, en unidades arbitrarias (UA), en ratas control y con LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico .	144
Tabla 34: Valores de expresión de P-selectina, en respuesta a ADP, en unidades arbitrarias (UA), en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, sin y con tratamiento crónico con ácido fólico.....	145
Tabla 35: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca ²⁺ intracelular en respuesta a Tr (0,3 U/ml), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico	148
Tabla 36: Valores del área bajo la curva (expresado en UA) de los niveles de ROS en respuesta a H ₂ O ₂ , Tr, ADP y Hcy, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tratadas crónicamente con ácido fólico	150



Figura 1: (A) Representación gráfica de la Agregación Plaquetaria expresada en área bajo la curva en respuesta al ADP (5 μ M), (B) Agregación Plaquetaria expresada en área bajo la curva en respuesta al ADP (5 μ M) en animales control (Ctrl) y con ligadura del conducto biliar (LCB) de 15, 21 días y con ascitis.....	100
Figura 2: (A) Representación gráfica de la Agregación Plaquetaria expresada en Agregación Máxima (%), (B) Agregación Máxima (%) en respuesta al ADP (5 μ M) en animales control (Ctrl) y con ligadura del conducto biliar (LCB) de 15, 21 días y con ascitis.....	101
Figura 3: Representación de la expresión de la P-selectina. Respuesta basal (sin activación) y tras la activación con ADP (5 μ M) (con 1 hr de incubación con salino) en animales control, LCB de 21 días y con Ascitis	102
Figura 4: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis	103
Figura 5: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/ml), en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis	104
Figura 6: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 U/ml) y ADP (5 μ M), en presencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis	105
Figura 7: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis	106
Figura 8: (A) Efecto de la Tapsigargina sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) Área bajo la curva en respuesta a la TG, (C) área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis.....	108
Figura 9: (A) Efecto del TBHQ sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) área bajo la curva en respuesta a TBHQ, (C) área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis.....	109
Figura 10: Representación de los cambios porcentuales de la fluorescencia a 360 nm tras la administración de de $MnCl_2$ (100 μ M) en plaquetas de animales control, LCB 21 días y ascitis.....	110
Figura 11: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME.....	111

Figura 12: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/ml), en ausencia de Ca^{2+} , (30 s de registro), en animales control y LCB de 21, tras ser tratadas crónicamente co L-NAME 112

Figura 13: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/ml), en la entrada de Ca^{2+} extracelular, (30 s de registro), en animales control y LCB de 21, tras ser tratadas crónicamente co L-NAME..... 113

Figura 14: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y Ascitis, tras ser tratadas crónicamente co L-NAME..... 113

Figura 15: (A) Efecto de la TG sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) área bajo la curva en respuesta a la Tapsigargina, (C) área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME 114

Figura 16: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis, tras ser tratadas agudamente con BSO 115

Figura 17: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular en respuesta a la Tr (0,3 U/ml) en ausencia de Ca^{2+} extracelular en plaquetas tratadas agudamente con BSO de animales control, (B) Área bajo la curva, del efecto del tratamiento agudo con y sin BSO en respuesta a Tr (0,3 U/ml), en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y con ascitis..... 116

Figura 18: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) área bajo la curva, del efecto del tratamiento agudo con y sin BSO en respuesta a la Tr (0,3 U/ml), en presencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y con ascitis 117

Figura 19: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) Área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con y sin BSO, en animales control, LCB de 21 días y ascitis 118

Figura 20: Entrada Capacitativa de Ca^{2+} (ECC). (A) Efecto de la TG sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} ; en plaquetas sin tratamiento agudo con BSO y (B) con tratamiento agudo con BSO, (C) área bajo la curva de la ECC tras la adición de TG y Ca^{2+} , en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con Ascitis tratadas agudamente con y sin BSO.. 119

Figura 21: Entrada Capacitativa de Ca^{2+} (ECC). (A) Efecto de l TBHQ sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular y tras la adición de Ca^{2+} ; en plaquetas con y sin tratamiento agudo con BSO en LCB de 21 días, (B) área bajo la curva del efecto de la TBHQ y (C) tras la adición de Ca^{2+} , en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis tratadas con BSO 121



Figura 22: Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a H ₂ O ₂ (1 mM), (7 min de registro), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis.....	122
Figura 23: (A) Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a Tr (0,3 U/ml), (B) mismos datos, expresados en área bajo la curva, (7 min de registro), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis	122
Figura 24: Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a ADP (5 μM) (7 min de registro), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis.....	123
Figura 25: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.....	125
Figura 26: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca ²⁺ (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino como control, en animales LCB de 21 días, ascitis y controles.....	126
Figura 27: (A) Cambios del Ca ²⁺ intracelular y (B) representación del área bajo la curva, de la Liberación de Ca ²⁺ intracelular (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino como control, en animales LCB de 21 días.....	127
Figura 28: (A) Cambios del Ca ²⁺ intracelular y (B) representación del área bajo la curva, de la entrada de Ca ²⁺ extracelular (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino, en animales LCB de 21 días.....	128
Figura 29: Cambios del Ca ²⁺ intracelular de los niveles totales de Ca ²⁺ (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino, representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.....	129
Figura 30: Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ (ECC). (A) Cambios del Ca ²⁺ intracelular del efecto de la TG y Ca ²⁺ , (B) área bajo la curva de la ECC, en respuesta a la TG y (C) en respuesta a Ca ²⁺ , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tratadas agudamente con ácido quenodesoxicólico (CDC), ácido desoxicólico (DC) y salino como control basal.....	130
Figura 31: Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ (ECC). (A) Cambios del Ca ²⁺ intracelular del efecto de la TBHQ y Ca ²⁺ , (B) Área bajo la curva de la Entrada Capacitativa del Ca ²⁺ , en respuesta a la TG y (C) en respuesta a Ca ²⁺ , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tratadas agudamente con ácido quenodesoxicólico (CDC), ácido desoxicólico (DC) y salino como control.....	132

Figura 32: Concentraciones de Hcy en plasma. Basal y post-sobrecarga con L-metionina, en animales control y LCB de 21 días.....	133
Figura 33: Efecto del tratamiento agudo con Hcy, a diferentes concentraciones, en el Área de agregación plaquetaria (expresada en %), tras ser estimuladas con ADP (5 μ M), en animales control y LCB de 15, 21 días y ascitis	134
Figura 34: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo Hcy.....	135
Figura 35: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy (10 y 25 μ M) y cisteína (Cys) como control basal, en animales control, LCB de 21 días y ascitis.	136
Figura 36: Cambios del Ca^{2+} intracelular de la Liberación de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy, representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis	137
Figura 37: (A) y (B) Cambios del Ca^{2+} intracelular de la Entrada de Ca^{2+} en respuesta a Tr (0,3 U/ml) tras la incubación con Hcy (10 y 25 μ M) en animales control y LCB de 21 días, respectivamente (30 s de registro), (C) representación del área bajo la curva de las figuras (A y B) de plaquetas tratadas agudamente con Hcy (10 y 25 μ M) y cisteína (Cys) como control basal, en animales control, LCB de 21 días y ascitis.....	138
Figura 38: Cambios del Ca^{2+} intracelular de los niveles totales de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy. Representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.....	139
Figura 39: Entrada Capacitativa de Ca^{2+} (ECC). Cambios del Ca^{2+} intracelular del efecto de la TG y Ca^{2+} , en plaquetas tratadas agudamente con Hcy. Representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.....	139
Figura 40: (A) Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a Hcy (200 μ M), (B) mismos datos, pero expresados en área bajo la curva, (7 min de registro), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis	140
Figura 41: Efecto del ácido fólico en la Agregación máxima plaquetaria expresada en porcentaje, en respuesta al ADP (5 μ M) en ratas control y LCB de 15, 21 días y con Ascitis.....	141
Figura 42: Efecto del tratamiento crónico del Ácido fólico en el Área de agregación plaquetaria en animales control y LCB, en respuesta al ADP (5 μ M).....	141
Figura 43: Porcentaje de descenso en el Área de agregación plaquetaria, tras el tratamiento crónico con Ácido fólico, en los diferentes grupos experimentales.....	142



Figura 44: Comparación del efecto del tratamiento crónico del ácido fólico (barras naranjas) vs sin tratamiento con ácido fólico (barras grises), en la expresión de la P-selectina. Respuesta basal (sin activación) y tras la activación con ADP (5 μ M) (con 1 hr de incubación con salino) en ratas control, LCB de 21 días y con Ascitis 143

Figura 45: Efecto del tratamiento crónico del ácido fólico en la expresión de la P-selectina en respuesta a ADP (5 μ M) en plaquetas incubadas con IL-6 (1 μ g/ml), TNF- α (1 μ g/ml), BSO (5 mM), Hcy (200 μ M), DC (100 μ M) y CDC (100 μ M) durante 1 hora 144

Figura 46: Efecto de la Tr (0,1 y 0,3 U/ml) sobre los niveles de Ca²⁺ intracelular, en ausencia Ca²⁺ extracelular. A la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta..... 146

Figura 47: Efecto del ADP la Tr (5 μ M) sobre los niveles de Ca²⁺ intracelular, en ausencia Ca²⁺ extracelular.. A la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta..... 146

Figura 48: Efecto de la Tr (0,1 y 0,3 U/ml) sobre la entrada de Ca²⁺ intracelular, en presencia de Ca²⁺ extracelular, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico..... 147

Figura 49: Efecto de la TG + Ionomicina sobre los niveles totales de Ca²⁺ intracelular, en ausencia de Ca²⁺ extracelular, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta., en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico..... 148

Figura 50: Efecto de la Tr (0,3 U/ml) sobre los niveles de ROS, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico, (7 min de registro)..... 149

Figura 51: Efecto de la Hcy (200 μ M) sobre los niveles de ROS, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico, (7 min de registro)..... 150

ABREVIATURAS



- * **AA:** Ácido araquidónico
- * **ADP:** Adenosina difosfato
- * **AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico
- * **ATP:** Adenosin trifosfato
- * **[Ca²⁺]_i:** Calcio intracelular
- * **[Ca²⁺]_c:** Calcio citoplasmático
- * **BD:** Cuerpos (*body*) densos
- * **BHMT:** Betaína-homocisteína-metiltransferasa
- * **β-TG:** β-tromboglobulina
- * **BSO:** Butionina sulfoxamina
- * **Cys:** Cisteína
- * **CCl₄:** Tetracloruro de carbono
- * **CβS:** Cistationina β-sintasa
- * **CBP:** Cirrosis biliar primaria
- * **CBS:** Cirrosis biliar secundaria
- * **CD:** del inglés "*Cluster of differentiation*": grupos de diferenciación
- * **CDC:** Ácido quenodesoxicólico
- * **CID:** Coagulación intravascular diseminada
- * **CO:** Ciclo oxigenasa
- * **COX:** Ciclo oxigenasa
- * **CE:** Capa exterior
- * **γ-CT:** Cistationina-γ-liasa
- * **DC:** Ácido desoxicólico
- * **DAG:** 1,2-diacilglicerol
- * **dTTP:** Desoxitimidín-trifosfato
- * **dUMP:** Desoxiuridín-monofosfato
- * **dUTP:** Desoxiuridín-trifosfato
- * **EGTA:** Ácido Etilen glicol-bis(β-aminoetil eter)N³,N⁷-tetraacético
- * **ECC:** Entrada Capacitativa de Ca²⁺
- * **FA:** Fosfatasa alcalina
- * **Fb:** Fibrinógeno
- * **Fn:** Fibronectina
- * **FITC:** Isocianato de Fluoresceína
- * **FH₂:** Dihidrofolato
- * **FSC:** del inglés *forward scatter*
- * **FH₄:** Tetrahydrofolato
- * **FT:** Factor tisular
- * **FTPI:** Inhibidor de la vía del factor tisular
- * **G:** Glicocalix
- * **Ga:** Gránulos alfa
- * **γ-CT:** Cistationina-γ liasa
- * **Gd:** Gránulos densos
- * **Glu:** Glutámico
- * **Gly:** Glicina
- * **GGT:** Enzimas γ-glutamyl-transpeptidasa
- * **GMPc:** Guanosin monofosfato cíclico
- * **GP:** Glicoproteína
- * **GPx:** Glutación Peroxidasa
- * **GSH:** Glutación
- * **GSSG:** Disulfuro de Glutación
- * **GTP:** Guanidina trifosfato
- * **Hcy:** Homocisteína
- * **HHcy:** Hiperhomocisteinemia
- * **His:** Histidina
- * **HMWK:** Kininógeno de alto peso molecular
- * **HMG-CoA:** 3-hidroxi3metilglutaril-coenzA sintasa
- * **IL:** Interleuquina
- * **ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular-1
- * **Iono:** Ionomicina
- * **IP₃:** 1,4,5 trifosfato de inositol
- * **IP₃R:** Receptor del 1,4,5 trifosfato de inositol
- * **JAMs:** Molécula de adhesión juncional
- * **LCB:** Ligadura del ducto biliar
- * **L-NAME:** L-NG-Nitroarginine Metil Ester
- * **LPS:** Lipopolisacáridos
- * **LVP:** Ligadura parcial de la vena porta
- * **M:** Mitocondrias
- * **Met:** Metionina
- * **MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos
- * **MLC:** Cadena liviana de miosina
- * **MLCK:** Cadena liviana de miosina kinasa
- * **MAPK:** Proteína quinasas activadas por mitógenos
- * **MS:** S-metiltransferasa
- * **MT:** Metil-transferasa
- * **MT:** Microtúbulos
- * **MU:** Membrana unitaria
- * **MTHF:** 5-metiltetrahydrofolato
- * **MTHFR:** Metilenotetrahydrofolato reductasa
- * **MTHFR:** Metilenotetrahydrofolato reductasa
- * **NAADP:** Ácido nicotínico adenina dinucleotido fosfato
- * **NCX:** Intercambiador Na⁺/Ca²⁺
- * **NO:** Óxido nítrico
- * **iNOS:** Oxido nítrico sintasa inducible
- * **eNOS:** Oxido nítrico sintasa endotelial
- * **cNOS:** Oxido nítrico sintasa constitutiva
- * **NSF:** Proteína de fusión sensible N-etilmaleimida
- * **NFAT:** Activación del factor de transcripción
- * **PAI-1:** Plasminógeno tipo 1
- * **PAF:** Factor activador de plaquetas
- * **PC:** Fosfatidilcolina
- * **PDGF:** Factor de Crecimiento Plaquetario
- * **PDF:** Productos de degradación de la fibrina
- * **PerCP:** Proteína clorofil-piridina
- * **PE:** Fosfatidiletanolamina
- * **PF4:** Factor plaquetario 4
- * **PG:** Prostaglandina
- * **PGI₂:** Prostaciclina I₂
- * **PGE₁:** Prostaglandina E₁
- * **PGs:** Endoperóxidos de prostaglandinas
- * **PIP₂:** Fosfatidilinositol bisfosfato
- * **PKA:** Proteína kinasa A
- * **PKC:** Proteína kinasa C
- * **PK:** Precalcreína
- * **PL:** Fosfolípido
- * **PLA₂:** Fosfolipasa A₂
- * **PLC:** Fosfolipasa C
- * **PLP:** Fosfato de piridoxal
- * **PMCA:** Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática
- * **PPP:** Plasma pobre en plaquetas
- * **PRP:** Plasma rico en plaquetas
- * **PSGL-1:** Glicoproteína ligando-1 de la P-selectina
- * **PTA:** Antecedente de Tromboplastina
- * **PTP:** Poro de transición permeable
- * **RE:** Retículo endoplasmático

-
- * **ROC:** Canales de Ca²⁺ operados por receptores
 - * **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
 - * **RyR:** Receptor de Rianodina
 - * **SIP:** Esfingosina 1-fosfato
 - * **SAM:** S-adenosilmetionina
 - * **SAH:** S-adenosilhomocisteína
 - * **SCA:** Sistema canicular abierto
 - * **SC:** Sistema canicular
 - * **Ser:** Serina
 - * **SERCA:** ATPasa-Ca²⁺ del Retículo Sarco-Endoplasmático
 - * **SMCE:** Entrada de Ca²⁺ mediada por almacenes
 - * **SMF:** Filamentos especializados
 - * **SMOC:** Canales operados por segundos mensajeros
 - * **SNAP-25:** del inglés: *Synaptosomal Associated Protein* (proteína asociada al sinaptosoma)
 - * **5-HT₂:** Serotonina
 - * **SNAP-25:** del inglés: *Synaptosomal Associated Protein*: proteína asociada al sinaptosoma
 - * **SNAREs:** Receptores del SNAP
 - * **SOC:** Canales operados por almacenes
 - * **SSC:** del inglés *side scatter*
 - * **SOCE:** Entrada de Ca²⁺ operada por almacenes
 - * **STIM1:** Molécula de interacción estromal 1
 - * **STD:** Sistema tubular denso
 - * **Tr:** Trombina
 - * **TFPI:** del inglés "*tissue factor pathway inhibitor*", vía del inhibidor del factor tisular
 - * **TBHQ:** Ter-butyl-benzohidroquinona
 - * **TG:** Tapsigargina
 - * **THF:** Tetrahidrofolato
 - * **TM:** Trombomodulina
 - * **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral
 - * **t-PA:** Activador tisular del plasminógeno
 - * **TP:** Tiempo de protrombina
 - * **TTPa:** Tiempo de tromboplastina parcial activado
 - * **TRP:** Potencial del receptor pasajero
 - * **hTRPC1:** Potencial del receptor pasajero canónico humano 1
 - * **TSP:** Trombospondina
 - * **TS:** Tromboxano sintetasa
 - * **TXA₂:** Tromboxano A₂
 - * **UDCA:** Acido ursodeoxicólico
 - * **VCAM-1:** Molécula de adhesión celular vascular
 - * **Vn:** Vitronectina
 - * **vWF:** Factor von Willebrand
 - * **VOC:** Canales Operados por Voltaje
 - * **XO:** Xantina Oxidasa

RESUMEN



ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA EN LA CIRROSIS BILIAR EXPERIMENTAL: HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

Introducción: En la cirrosis hepática se producen diversas alteraciones hemostáticas, incluyendo episodios de sangrado, aunque en un 9-20 % hay riesgo de trombosis. Algunos factores extrínsecos e intrínsecos están alterados en estos pacientes y su papel en el desarrollo de esas alteraciones no es completamente conocido.

Objetivos: Investigar el papel de la homocisteína (Hcy), ácidos biliares, óxido nítrico (NO) y ácido fólico en la función plaquetaria de ratas con cirrosis experimental.

Metodología: Se han usado plaquetas de ratas con ligadura del conducto biliar (LCB), en las que se determinó su capacidad de agregación, los niveles de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y su regulación, así como el papel de las especies-reactivas de oxígeno (ROS) y la expresión de la P-selectina.

Conclusiones: Los animales LCB sin ascitis, presentan mayor agregación, movilización de $[Ca^{2+}]_i$, producción de ROS y expresión de P-selectina y menor entrada de calcio Capacitativa (ECC). Los animales LCB con ascitis, sin embargo, no muestran muchas de estas alteraciones. La ausencia de NO y/o la presencia de ácidos biliares hace que disminuya la ECC en LCB. El ácido fólico puede revertir la hiperagregación, sobreexpresión de P-selectina, reducir la liberación de Ca^{2+} de los almacenes y normalizar la producción de ROS.

Palabras clave:

Ligadura del conducto biliar (LCB), homocisteína (Hcy), óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), ácido desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC).



CHANGES OF PLATELET FUNCTION IN EXPERIMENTAL BILIARY CIRRHOSIS: INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS

Introduction: In liver cirrhosis, several haemostatic abnormalities occur, mostly episodes of bleeding, but there is a 9-20 % risk of thrombosis. Some extrinsic and intrinsic factors are altered in these patients and their role in the development of these alterations is not completely known.

Objetives: To investigate the role of homocysteine (Hcy), bile acids, nitric oxide (NO) and folic acid on platelet function of rats with experimental cirrhosis.

Methodology: We have used platelets of rats with bile duct ligation (BDL), to measure aggregation, Ca^{2+} -intracellular levels and its regulation ($[Ca^{2+}]_i$), reactive oxygen species-(ROS) and the expression of P-selectin.

Conclusions: LCB rats without ascites show greater platelet aggregation, mobilization of $[Ca^{2+}]_i$, ROS production and expression of P-selectin and less capacitative calcium entry (ECC). In platelets of LCB with ascites, many of these alterations are absent. The absence of NO and/or presence of bile acids reduce ECC in platelets of LCB animals. Folic acid can reverse the hyperaggregation, overexpression of P-selectin, reduce the release of Ca^{2+} stores and normalize ROS production.

Keywords:

Bile duct ligation (BDL), homocysteine (Hcy), nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), capacitative Ca^{2+} entry (ECC), intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$), deoxycholic acid (DC) and chenodeoxycholic (CDC).



ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA EN LA CIRROSIS BILIAR EXPERIMENTAL: HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

RESUMEN

La cirrosis es el estadio final de un gran número de enfermedades que afectan al hígado, considerándose como una de las diez principales causas de mortalidad a nivel mundial (Trejo-Solis y cols., 2003; OMS, 2005). En pacientes con cirrosis coexisten trastornos de coagulación que promueven el sangrado, con alteraciones procoagulantes que inducen la aparición de trombosis. Entre estas últimas se pueden mencionar la disminución de la actividad de algunos mecanismos de anticoagulación, enlentecimiento del flujo circulatorio, trastornos en la fibrinólisis y en la actividad plaquetaria (Caldwell y cols., 2006). El aumento de la actividad plaquetaria puede ocasionar coagulación intravascular diseminada con características que no corresponden con un característico tipo de coagulación como ausencia de producción exagerada de trombina, niveles normales del factor VIII y menor incidencia de lesiones orgánicas isquémicas secundarias a trombosis intravascular (Caldwell y cols., 2006). Dependiendo del grado de avance de la cirrosis hepática, fundamentalmente la aparición de ascitis muestra distintas alteraciones, diferentes estudios indican que la enfermedad colestática está asociada por un incremento de riesgo de sangrado, aunque se ha descrito que entre un 9-20 % de los enfermos puede sufrir trombosis venosa (Ben-Ari y cols., 1997; Pihusch y cols., 2002).

Para que se produzca la estimulación plaquetaria es necesario un incremento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), el cual consta de dos componentes: aumento del Ca^{2+} intracelular desde los almacenes internos y entrada de Ca^{2+} extracelular por los canales de la membrana plasmática (Redondo y cols., 2004). Datos bibliográficos indican que hay un defecto en la movilización del Ca^{2+} en respuesta a agonistas como trombina en pacientes con cirrosis de origen alcohólico o viral (Bandi y cols., 1997); en pacientes con cirrosis de origen colestático, no hay mucha información al respecto, aunque trabajos de nuestro laboratorio, en un modelo experimental de cirrosis (ligadura del conducto biliar, LCB) muestran un mayor almacenamiento de $[Ca^{2+}]_i$ disponible en el momento de su activación debido a una mayor actividad de la SERCA, bomba encargada de recaptar el calcio intracelular tras los estímulos (Atucha y cols., 2005, 2007; Iyu y cols., 2005); sumado a ello, también se observó una menor entrada capacitativa (ECC), que es un mecanismo importante en la generación de señales de la homeostasis del Ca^{2+} celular.

Pero, ¿cuáles son los factores que producen un aumento en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$? Aunque no están completamente elucidados, hemos encontrado diversos trabajos que han demostrado la existencia de un aumento de homocisteína (Hcy) en el plasma de pacientes con cirrosis alcohólica y no alcohólica; por ello, la hiperhomocisteinemia (HHcy) ha sido asociada al curso de la enfermedad del hígado, del riñón y enfermedades aterotrombóticas

vasculares (García-Tevijani, 2004; Hohammad, 2005; Lenz, 2005). En el 2000, Thombyjeh y cols demostraron que la Hcy puede inhibir mecanismos anticoagulantes reduciendo la función de la antitrombina III; además, elevadas concentraciones de Hcy son capaces de organizar lipoproteínas vinculadas a la fibrina, reduciendo la activación del plasminógeno. La Hcy incrementa los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, induciendo un aumento de ácido araquidónico (AA), formación de TXA_2 y especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando en un incremento en la agregación y secreción plaquetaria (Leoncini, 2003). Las ROS, incluyendo H_2O_2 , son muy importantes mensajeros intracelulares necesarios para la activación de un gran número de mecanismos de señales de transducción, en muchos tipos celulares (Rosado y cols., 2004), incluyendo la elevación del $[Ca^{2+}]_i$, debido principalmente a la inhibición de la SERCA y consecuente activación de los canales de Ca^{2+} ; además, el H_2O_2 puede modificar el $[Ca^{2+}]_i$ por interacción con la PMCA, el principal mecanismo involucrado en la eliminación del Ca^{2+} intracelular en las plaquetas humanas (Redondo, 2004).

También se ha descrito, en células endoteliales y fibroblastos, que los ácidos biliares tienen efectos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ compatibles con una mayor movilización, aunque en las plaquetas no hay nada claro todavía.

Otro posible participante es el óxido nítrico (NO), un mediador local ampliamente reconocido como participante en la fisiopatología de las alteraciones cardiovasculares y renales de la cirrosis hepática (Criado y cols., 2005; Atucha y cols., 2005). El análisis de la literatura también apoya la hipótesis de que el NO puede estar jugando un papel decisivo en estas alteraciones (Dedkova y cols., 2002), al aumentar la receptación de calcio por los almacenes (Trepakova y cols., 1999).

Uno de los tratamientos para reducir el riesgo vascular puede ser el reducir los niveles de Hcy en la sangre; en la última década, se han publicado diversos artículos que han apuntado a un papel del ácido fólico en la fisiopatología de la cirrosis ya que ensayos en plasma han revelado niveles subnormales de folato en pacientes cirróticos (Hawkinson y cols., 2002). Experimentos realizados por Durand y cols. (1996) demostraron que una depleción de ácido fólico potencia la actividad plaquetaria por un aumento en la actividad del AA y la consiguiente elevada formación de TXB_2 , existiendo además un desbalance de ácidos grasos plaquetarios y plasmáticos.

Es muy probable que en la fase final de la enfermedad (con presencia de ascitis), en la que hay una mayor tendencia al sangrado, exista un deterioro de la función plaquetaria que incluya una alteración de los mecanismos de señalización del calcio, además de la trombopenia, como puede ser un mayor descenso de la entrada capacitativa o del tamaño de los almacenes. De confirmarse, sería muy interesante encontrar los mecanismos moleculares implicados en este deterioro, ya que se podría intentar combatir el riesgo de hemorragias de estos enfermos con cirrosis avanzada.

Para intentar avanzar en el conocimiento de estas alteraciones, hemos preparado los siguientes objetivos.



Objetivos:

- Analizar la agregación plaquetaria, expresión de P-selectina, movilización del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plaquetas de ratas con LCB con ausencia y presencia de ascitis.
- Estudiar el papel del óxido nítrico (NO), mediante la inhibición crónica de su síntesis con L-NAME o tras la reducción de su disponibilidad con butionina sulfoximina (BSO), en la movilización del Ca^{2+} intracelular, en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis.
- Estudiar el papel de los ácidos biliares (ácido desoxicólico y quenodesoxicólico) en la movilización del Ca^{2+} y expresión del receptor de activación (P-selectina), en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis.
- Estudiar el papel de la homocisteína (Hcy) en la agregación plaquetaria, expresión de P-selectina, movilización del Ca^{2+} intracelular y producción de especies reactivas de oxígeno, en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis, mediante el tratamiento crónico con ácido fólico.

Metodología:

Los experimentos se realizaron en ratas cirróticas (mediante ligadura del conducto biliar: LCB) y sus controles. La agregación plaquetaria en respuesta a ADP ($5 \mu\text{M}$) se midió en plasma rico en plaquetas mediante un lumiagregómetro. Para la medición de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y ROS hemos usado agonistas como la Trombina ($0,3 \text{ U/ml}$), ADP ($5 \mu\text{M}$) y Hcy (10 a $100 \mu\text{M}$) y ácidos biliares (desoxicólico: DC y quenodesoxicólico: CDC) y para el descenso en la disponibilidad de NO se utilizó butionina sulfoximina (BSO). Las plaquetas fueron incubadas con Fura-2 (para la detección de $[\text{Ca}^{2+}]_i$) y CM-H2DCFDAacetil-ester (para la detección de ROS) y analizadas por espectrofotometría de fluorescencia. En algunos experimentos, los animales fueron tratados con ácido fólico en el agua de bebida (8 mg/Kg/día) y L-NAME (1 mg/Kg/día). La detección del receptor de activación plaquetaria (P-selectina) fue realizada con citometría de flujo, siendo las plaquetas previamente incubadas con Hcy, ácidos biliares, citoquinas: IL-6 y $\text{TNF}\alpha$.

Resultados:

1. Los animales con LCB presentan una mayor agregación plaquetaria in vitro, tanto si se expresa como porcentaje máximo o como duración de la respuesta. La presencia de ascitis, revierte esta alteración e incluso reduce notablemente la duración de la respuesta.

- **FACTORES INTRÍNSECOS:**

2. Basalmente, hay una mayor expresión del receptor de activación (P-selectina) en plaquetas de animales cirróticos (sin y con ascitis) que en las del grupo control. La estimulación con agonista (ADP) aumenta la expresión en todos los grupos, pero este aumento es mucho mayor en el grupo cirrótico sin ascitis.
3. Los niveles basales de Ca^{2+} son más altos en las plaquetas de los animales cirróticos (Fig. 4). En el grupo de cirrosis sin ascitis, la respuesta a los agonistas ADP y trombina produce un mayor aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} , estimado por la respuesta a taspigargina mas ionomicina es mayor (Fig. 5, 6 y 7 respectivamente). La ECC, está disminuida en las plaquetas de las ratas cirróticas y la aparición de ascitis altera aún más este proceso (Fig. 8).

Papel del NO: respuesta a L-NAME crónico

4. La inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME no mejora las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} citoplasmático en las plaquetas de los animales cirróticos (Fig. 11, 12 y 14).

Disminución de la disponibilidad de NO, tras el tratamiento agudo con BSO

5. Se observa que la reducción de los niveles de NO en la plaquetas, reduce basalmente la $[Ca^{2+}]_i$, normalizando los niveles de Ca^{2+} en el grupo de LCB (21 días) (Fig. 16). También observamos una reducción de los almacenes de Ca^{2+} , tanto en plaquetas de animales LCB (21 días) como en el grupo control. En la ECC, el BSO es capaz de disminuir aún más la entrada de Ca^{2+} a los almacenes en los animales LCB (21 días) (Fig. 19 y 20).
6. Basalmente no se observan diferencias en la producción de ROS, entre plaquetas de animales cirróticos con respecto al grupo control. Pero tras la estimulación con el agonista (trombina), las plaquetas de los animales cirróticos producen una mayor cantidad de ROS que su grupo control (Fig. 22).

- **FACTORES EXTRÍNSECOS:**

EFFECTO AGUDO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

7. La incubación con los ácidos desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC) no altera la sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina) encontrada en las plaquetas de animales LCB (21 días) (Fig. 24).



8. Los ácidos biliares DC y CDC son capaces de aumentar los niveles basales de Ca^{2+} intracelular tanto en plaquetas de animales cirróticos como en animales control (Fig. 25). La incubación con DC hace que disminuya la respuesta al agonista (trombina), por lo que a su vez también observamos una disminución de los almacenes de Ca^{2+} intracelular en animales cirróticos y controles (Fig. 26 y 27). La ECC también se ve doblemente disminuía en los tres grupos de estudio, tanto con el tratamiento con DC como con CDC (Fig. 29).

EFEECTO AGUDO DE LA HOMOCISTEÍNA (Hcy)

9. Tras la sobrecarga con L-metionina, tanto en animales cirróticos como en controles, vemos que los niveles de Hcy en plasma, son significativamente más altos en animales LCB con respecto a su grupo control (Fig. 31).
10. La incubación con Hcy a concentraciones crecientes (1, 25 y 100 μM) aumenta la respuesta de agregación al ADP en controles y LCB (15 y 21 días); en cambio, en los animales con presencia de ascitis la Hcy no altera su respuesta (Fig. 32).
11. La incubación con la Hcy, no altera la sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina), ya encontrada en plaquetas de animales LCB (21 días) (Fig. 33).
12. La Hcy aumenta los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en el grupo control (10 y 25 μM) y sin ascitis (25 μM) (Fig. 34). Además, la Hcy (25 μM) aumenta la respuesta al agonista (trombina) en estos dos grupos (Fig. 36). Sin embargo, no es capaz de alterar el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} intra-plaquetarios ni la ECC, en ninguno de los grupos de estudio (Fig. 37).
13. La Hcy (200 μM) produce una mayor cantidad de ROS en el grupo cirrótico, siendo esta más significativa en el grupo con ascitis (Fig. 39).

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ACIDO FÓLICO

14. El tratamiento con ácido fólico disminuye la respuesta de agregación plaquetaria, sobre todo en el grupo cirrótico, siendo este descenso mucho más pronunciado en ausencia de ascitis (con un 57,5 % de descenso) (Fig. 40 y 42) (Tabla L, anexos).
15. El tratamiento crónico con ácido fólico no altera la expresión basal de la P-selectina, pero disminuye la respuesta a ADP en todos los grupos experimentales (Fig. 43).
16. Tras el tratamiento crónico con ácido fólico, ni los niveles basales de Ca^{2+} intracelular, tamaño de los almacenes de Ca^{2+} , ni la ECC, se normalizan en los animales de

estudio. Pero sí produce una disminución en cuanto a la respuesta a agonista (trombina) en el grupo de cirrosis sin ascitis (Fig. 47).

17. El tratamiento crónico con ácido fólico disminuye la excesiva producción de ROS en respuesta a trombina u Hcy en las plaquetas de los animales cirróticos, normalizándola (Fig. 49 y 50).

Conclusiones:

1. Los animales con cirrosis biliar experimental por ligadura del conducto biliar (LCB), sin presencia de ascitis, presentan una mayor agregación plaquetaria. Esta alteración está relacionada con una mayor movilización del Ca^{2+} intracelular, pero con una menor ECC. Sumado a ello, presentan sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina) y una mayor producción de ROS. La presencia de ascitis revierte parte de estas alteraciones, llegando incluso a producir una hipoagregación, que se acompaña de una gran disminución de la ECC y una excesiva producción de ROS.
2. El óxido nítrico (NO) tiene un papel en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en las plaquetas de animales LCB, ya que su ausencia hace que disminuya aún más la ECC.
3. Un aumento plasmático de ácidos biliares, como el desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC), podría explicar en parte los niveles elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ plaquetario basal y la menor ECC en animales con cirrosis biliar experimental. Sin embargo, estos ácidos biliares no están relacionados con la sobreexpresión de la P-selectina encontrada en los animales cirróticos sin ascitis.
4. El tratamiento crónico con ácido fólico puede ser efectivo en la cirrosis biliar, en una fase pre-ascítica, ya que revierte la hiperagregación plaquetaria y produce una menor expresión de la P-selectina en respuesta a agonista. Esto se acompaña de una normalización en la producción de ROS y una menor liberación de Ca^{2+} de los almacenes, aunque sin cambios en la ECC.
5. Diversos factores plasmáticos (Hcy, NO, ácidos biliares) pueden contribuir a la hiper- excitabilidad plaquetaria de la cirrosis biliar experimental sin ascitis, mediante un aumento excesivo de los niveles de Ca^{2+} y/o producción de ROS. La aparición de ascitis reduce la duración de la respuesta de agregación, lo que puede ser explicado por la mayor producción de ROS.

I

INTRODUCCIÓN



1. PLAQUETAS

- 1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES
- 1.2 ESTRUCTURA PLAQUETARIA
 - 1.2.1 MEMBRANA PLAQUETARIA
 - 1.2.2 SISTEMA DE MEMBRANAS INTERNO
 - 1.2.3 CITOESQUELETO PLAQUETARIO
 - 1.2.4 GRÁNULOS ESPECÍFICOS
- 1.3 FUNCIÓN PLAQUETARIA
 - 1.3.1 HEMOSTASIA PRIMARIA
 - 1.3.2 HEMOSTASIA SECUNDARIA
 - 1.3.3 RETRACCIÓN DEL COÁGULO Y FBRINÓLISIS

1. PLAQUETAS

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

En 1880, Bizzozero y Harem, de forma independientemente, describieron unas partículas de la sangre, previamente observadas por otros, como unos corpúsculos más pequeños que las células rojas y blancas y que ellos llamaron hemoblasto o plaqueta (Zucker y col., 2007). Bizzozero describió que la pérdida de sangre producida por la lesión vascular, es bloqueada por una acumulación de plaquetas, que forman un trombo blanco. Diferencian así un tipo de células que poseen la propiedad de aglutinarse y adherirse a las superficies extrañas, demostrando su participación en la trombosis y en la coagulación sanguínea así como en la inflamación y aterogénesis (Shapiro, 1999).

ORIGEN

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos citoplasmáticos producidos por los megacariocitos en la médula ósea. Los megacariocitos son células mieloides raras (constituyendo menos del 1 % de estas células) que residen principalmente en la médula ósea, pero también se han encontrado en el pulmón y en la sangre periférica. Un megacariocito tiene un tiempo de vida corto, incluyendo procesos que envuelven la destrucción y la liberación de los residuos del cuerpo celular y del material nuclear y culminando en la liberación de 100 a 1000 plaquetas (Richardson y cols., 2005; Patel y cols., 2005).

Los megacariocitos no solo deben producir y replicar el citoesqueleto especializado de cada plaqueta, sino también cargan a las plaquetas con la asignación apropiada de organelas y gránulos esenciales para su función hemostática. Los megacariocitos maduros al ser estimulados con trombopoyetina, replican el contenido de su núcleo, incrementan el volumen plasmático y a partir de evaginaciones de su membrana emiten extensiones de las que se van originando agregados plaquetarios, llamados protoplaquetas. En un periodo de

4 a 10 horas, las plaquetas adquieren la forma discoidal aplanada de 2-3 μm de diámetro (Fig. 1) (Redondo, 2004; Richardson y cols., 2005; Patel y cols., 2005).

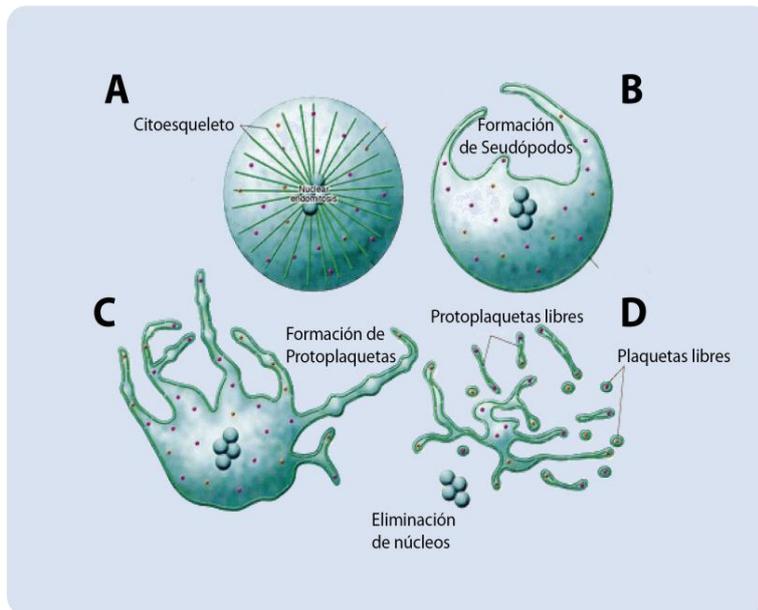


Figura 1: Producción de plaquetas por el megacariocito.

(A) Megacariocito, (B) comienzo de la formación de protoplaquetas, (C) elongación dirigida por microtúbulos donde las organelas son dirigidas a la protoplaqueta, (D) el megacariocito es convertido en una masa de protoplaquetas, los núcleos son eventualmente eliminados de las protoplaquetas finales y son liberadas las plaquetas (Patel y cols., 2005).

Las plaquetas se clasifican como células, pero no tienen núcleo. Tienen forma discoidal y un aspecto granular. El número de plaquetas circulantes oscila entre 150.000-450.000 plaquetas/ μl en los humanos y 500.000-1.300.000 plaquetas/ μl en ratas (Watson y cols., 1996); el 70 % están en la circulación y el 30 % en el bazo. Permanecen en circulación durante un promedio de 7 a 10 días y su ciclo vital termina cuando se produce el coágulo sanguíneo o hay algún trauma en los vasos. Una vez transcurrido ese tiempo el “*sistema fagocítico mononuclear*” en el bazo (por macrófagos) e hígado (por las células Kuffer) las retiran (Zucker y cols., 2007; Redondo, 2004).

1.2 ESTRUCTURA PLAQUETARIA

La estructura de las plaquetas se adapta a la gran variedad de funciones que deben desempeñar, con zonas anatómicas preferentemente dedicadas a cada una de ellas: en la membrana plaquetaria se producen las interacciones con el exterior, el citoesqueleto es el responsable de la contracción celular, los gránulos específicos almacenan sustancias pro-hemostáticas, pro-cicatrizantes y activadoras de las propias plaquetas y los sistemas membranosos amplifican la superficie plaquetaria y alojan componentes químicos involucrados en la activación. Las plaquetas poseen además estructuras anatómicas destinadas a algunas funciones celulares específicas, como el metabolismo energético, una escasa capacidad de síntesis proteica, y mecanismos de endocitosis y exocitosis (García Allut, 2000).

1.2.1 MEMBRANA PLAQUETARIA

La membrana constituye el límite o separación de la plaqueta con el exterior, no solo en su superficie biconvexa principal, sino también de los canales intraplaquetarios. Está integrada por tres capas:

- **Glucocálix (G):** Es la cubierta exterior, mide de 15-20 nm de grosor y contiene diversos receptores, entre ellos el complejo glicoproteico Ib-IX, que interacciona con el factor von Willebrand en el proceso de adhesión, y el complejo glicoproteico IIb-IIIa, que lo hace con el fibrinógeno en la agregación. También presenta otros receptores capaces de iniciar la activación plaquetaria (Fig. 2).
- **Membrana unitaria (MU):** Es la bicapa fosfolipídica, asimétrica, rica en ácido araquidónico. En respuesta a la activación, la membrana se carga negativamente, siendo esencial como soporte a los factores de coagulación (actividad procoagulante), y el ácido araquidónico entra en el metabolismo de los eicosanoides, participando en la transmisión del estímulo recibido en la membrana hacia las regiones celulares efectoras (Fig. 2).
- **Área sub-membranosa:** Está unida a las porciones trans-membranosas de algunas glicoproteínas y contiene filamentos sub-membranosos, que forman parte del citoesqueleto (Fig. 2). En esta zona se produce la transformación de las señales recibidas en la superficie exterior, en los mensajes químicos y alteraciones físicas que activarán a la plaqueta (Patel y cols., 2005).

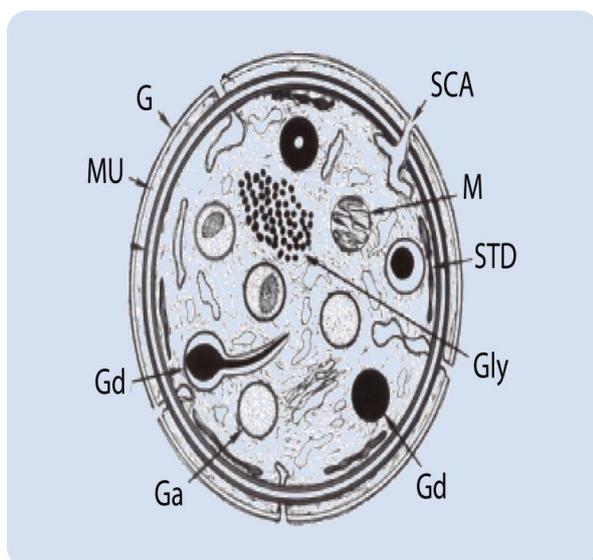


Figura 2: Dibujo esquemático de una plaqueta.

Los componentes de la zona periférica incluyen el Glicocálix (G), membrana unitaria (MU) y área de sub-membranas: La matriz del interior es la zona sol-gel que contiene filamentos de actina, glicógeno (Gly), también incluyen a mitocondrias (M), gránulos α (Ga) y gránulos densos (Gd). Colectivamente constituyen la zona de organelas. Los sistemas de membranas incluyen el sistema canalicular abierto conectado a la superficie (SCA) y el sistema tubular denso (STD) que es el retículo endoplásmico en la plaqueta (Shapiro, 1999; White, 1998; Lodish y cols., 2005).

1.2.1.1 Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión son proteínas trans-membrana que se encuentran en la superficie de las células e intervienen en el mantenimiento de la integridad de un tejido y en el control de ingreso de mediadores. Estas moléculas las podemos agrupar en **glicoproteicas** (receptores glicoproteicos) y **no glicoproteicos** (receptores no glicoproteicos) (García, 2009). Haremos una breve descripción de las moléculas implicadas en la función plaquetaria.

a. Glicoproteínas

Las glicoproteínas (GP), son proteínas unidas covalentemente a carbohidratos, cuya función principal es el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmática, es decir actúan como receptores (**receptores glicoproteicos**). En las plaquetas median entre otras, dos funciones de capital importancia para el mantenimiento de una hemostasia correcta: la adhesión de las plaquetas sobre las superficies vasculares dañadas y la interacción plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria. Clásicamente las GP, han sido clasificadas en distintas familias: integrinas, GP ricas en leucina, selectinas y la superfamilia de inmunoglobulinas.

a.1 Integrinas

Son GP de membrana con dos subunidades principales designadas α/β . Actúan como mediadores en los procesos de adhesión celular, por interacción de una amplia variedad de ligandos proteicos extracelulares que contienen la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp. La subunidad $\beta 1$, es compartida por unos receptores descritos en los linfocitos T activados, este grupo también incluye a los receptores de membrana plaquetaria para la fibronectina. Las integrinas con subunidad $\beta 2$, se han identificado predominantemente en leucocitos. Los receptores con la subunidad $\beta 3$ constituyen la familia de las citoadhesinas, que incluyen receptores de membrana plaquetaria para el fibrinógeno y la vitronectina (Mulvihill y cols., 2002; Hynes, 1991; Newman, 1991).

- **Complejo glicoproteico IIb-IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta 3$):** Es el complejo más abundante en la membrana plaquetaria, es el lugar de unión de diferentes proteínas adhesivas: fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina, trombospondina y colágeno. Este complejo juega un papel importante en la agregación plaquetaria, actuando como receptor del fibrinógeno, molécula que al unirse a la GP IIb-IIIa de las plaquetas activadas, forma un puente entre ellas, favoreciendo la agregación de las mismas. También participa en la retracción del coágulo, proporcionando un lugar de unión entre el citoesqueleto de las plaquetas activadas (talina y vinculina) en la parte citoplasmática y la membrana plasmática (Yang y cols., 2003).



- **Glicoproteína IV (GP IIIb):** Además de estar presente en las plaquetas, también las encontramos en monocitos, células endoteliales y eritrocitos indiferenciados. Es receptor de la trombospondina y del colágeno. Si bien no es esencial para la unión plaqueta-colágeno, actúa acelerando el proceso (Yang y cols., 2003).
- **Glicoproteína VI:** Este receptor es el que desempeña el papel más importante en la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno (Kehrel y cols., 1998). Por otra parte, orientada hacia la cara interna de la membrana, va a transmitir la señal hasta provocar la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos internos (Suzuki-Ionoue y cols., 2002).
- **Glicoproteína Ia y IIa (VLA-2, $\alpha 2\beta 1$):** Este receptor es específico para adherir las plaquetas al colágeno (tipo I/IV) y al factor von Willebrand de manera independiente de la adhesión plaquetaria a la pared del vaso sanguíneo. Estos receptores son de suma importancia para el comportamiento de la plaqueta y se cree que aumentan el riesgo de que suframos trombosis tras la ruptura plaquetaria (Okuda y cols., 2003).
- **Glicoproteína Ic y IIa (VLA-5, $\alpha 5\beta 1$):** Reconocen de manera específica a la fibronectina y permite que la plaqueta se adhiera al sustrato. También son capaces de formar heterodímeros con GP Ia, para poder unirse al colágeno (Gilbert, 1999).

a.2 Glicoproteínas ricas en leucina

Esta familia de GP está constituida por proteínas con similitudes estructurales aunque no funcionales. Todas presentan una secuencia de 24 aminoácidos con un alto contenido en leucina. En la membrana plaquetaria encontramos al **complejo GP Ib-IX-V**, que juega un rol central en la adhesión de las plaquetas a las paredes del vaso dañado por interacción con el factor von Willebrand (vWF) unida a colágeno (Bennett, 1991).

a.3 Selectinas

Estas moléculas de adhesión celular interactúan con ligandos de carbohidratos sobre leucocitos y células endoteliales. Las selectinas se nombran según el tipo de célula en que fueron originalmente identificadas: endoteliales (E-selectina), plaquetas (P-selectina) y leucocitos (L-selectina) (Fig. 3). Entre estas moléculas la P-selectina es la más conocida, debido a su expresión en condiciones definidas tanto en plaquetas como en células endoteliales.

P-Selectina: La P-Selectina (CD62P) llamada así por ser definida originalmente en plaquetas (activadas), también recibe el nombre de proteína de membrana granular (GMP-140) o proteína de activación plaquetaria dependiente de la membrana externa granular (PADGEM), con un peso molecular de 140 kDa. Es un componente de la

membrana de los gránulos α y gránulos densos de las plaquetas y también de la membrana de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. Media la interacción entre leucocitos y células endoteliales.

Tras la activación plaquetaria, se expresan aproximadamente 10.000 moléculas de P-selectina en la superficie de plaquetas, utilizándose en clínica como un marcador de activación plaquetaria (McEver., 2001).

Al igual que las otras selectinas, P-selectina tiene un dominio lectina N-terminal, un factor de crecimiento epidérmico, (generalmente) nueve repeticiones de la proteína reguladora, una región trans-membrana y una cola corta intra-citoplasmática (Fig. 3) (Blann y cols., 2003). Su ligando de unión es, PSGL-1 (glicoproteína ligando-1 de la P-selectina), una proteína expresada en la superficie de leucocitos, células endoteliales y plaquetas.

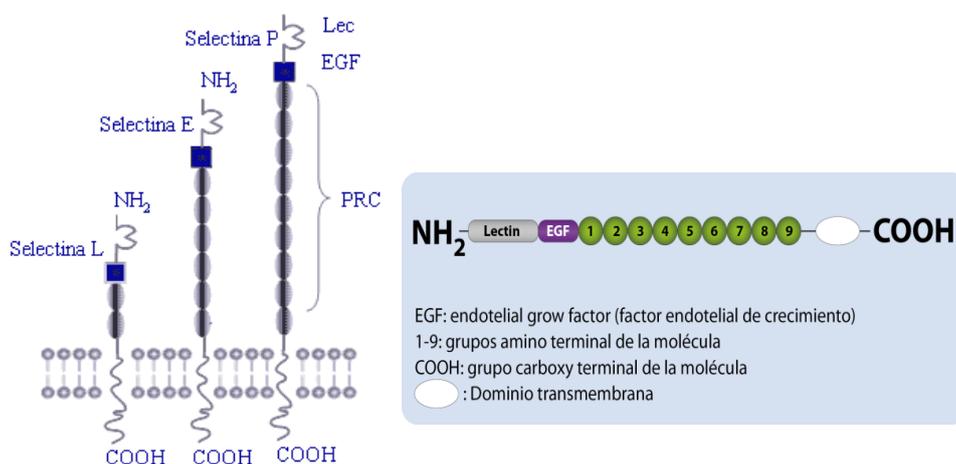


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de las selectinas. Incluye un dominio tipo lectina, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembranal y una región intracitoplásmica corta en el extremo carboxilo terminal (Blenn y cols., 2003).

La expresión de la P-selectina en la membrana plasmática, no parece ser simplemente para ayudar a los leucocitos y/o a la adhesión endotelial, hay pruebas de que también es importante para la agregación entre plaquetas, la estabilización inicial de la interacción GP IIb/IIIa-fibrinógeno, lo que permite la formación de grandes y estables agregados plaquetarios. Merten y cols., mostraron que inhibiendo la P-selectina con un anticuerpo monoclonal se producía entre un 95-100 % de desagregación, mientras que los anticuerpos contra PSGL-1, GP Ib o GP IIb/IIIa no tuvieron efecto. Esto muestra, además, que la P-selectina causa la agregación a través de otros receptores diferentes al PSGL-1 (Merten y cols., 2000).

Además de las propiedades antes mencionadas de la P-selectina, en la facilitación de la adhesión de las plaquetas y los neutrófilos al endotelio, también se ha sugerido que la adhesión es responsable de activar el endotelio y de la creación de un mecanismo de retroalimentación positiva. De hecho, la P-selectina tiene



actividades procoagulantes en la que regula la producción del Factor Activador de Plaquetas (PAF) por los monocitos, y a la vez estos aumentan la fagocitosis (Elstad y cols., 1995). Además inducen la formación de **factor tisular** (TF) esto hace posiblemente que tenga un rol importante en la inflamación y aterogénesis (Polanowska y cols., 2010; Lindmark y cols., 2000; Furie y col., 1996; Celi y cols., 1994).

a.4 Superfamilia de Inmunoglobulinas

Los miembros de esta familia se caracterizan por tener los llamados dominios inmunoglicoprotéicos que consisten en dos láminas peptídicas en estructura β -plegada y en disposición antiparalela estabilizadas por puentes disulfuro. El conjunto de los genes que codifican estas moléculas ha sido designado “*superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas*”, cumpliendo un gran variedad de funciones biológicas importantes, como en la adhesión, diferenciación celular, así como en la angiogénesis, inflamación y en las repuestas inmunitarias (García, 2011). Estas moléculas, median la adhesiones célula-célula homotípicas y comprenden a las ICAM-1-2-3-4-5 (molécula de adhesión intracelular), C-CAM (molécula de adhesión célula-célula), VCAM-1 (molécula de adhesión vascular), PECAM-2 (molécula de adhesión plaqueta-endotelio), JAMs (moléculas de adhesión juncional o de unión adherente entre endotelio-leucocito o leucocito-plaqueta), NCAMs (molécula de adhesión neuronal) y muchas estructuras (Ross & Pawlina, 2007; MeSH, 2010).

En la tabla 1, hacemos un resumen de las glicoproteínas presentes en las plaquetas.

b. Receptores no glicoproteicos

Estas moléculas de adhesión no GP, que regulan también la activación y agregación plaquetaria, incluyen receptores para el ADP (P2Y₁, P2Y₁₂ y P2X₁), la trombina (PAR-1, PAR-3, PAR-4), la serotonina (5-HT₂), la adrenalina (receptor α_2 , receptor β_1) y para diferentes prostanoides (Prostaglandina, Prostaciclina y Tromboxano).

Por ejemplo, el ADP se une a las plaquetas en reposo a través de un receptor altamente específico (P2Y₁₂). Esta unión induce la exposición de la GPIIb-IIIa, para que se produzca la agregación plaquetaria a través de puentes de fibrinógeno. Además, el ADP actuaría inhibiendo la adenil-ciclasa, enzima que interviene en los procesos de inhibición plaquetaria, mediante un incremento en los niveles de AMPc (Bennet y col., 1979; Colman, 1984; Angiolillo & Ferreiro, 2010).

O bien, cuando la adrenalina actúa sobre los receptores adrenérgicos (α_2 ó β_1) induciendo la agregación plaquetaria sin que exista un previo cambio de forma, y potenciando a la vez concentraciones sub-umbrales de otros agonistas.

Tabla 1: Glicoproteínas presentes en las plaquetas.

Receptor GP	Expresión	Ligando	Referencia
GPIb (CD42a/b)	Constitutivamente	Trombina, vWF, P-selectina, Mac-1, GPIb y TSP	(Nachman y cols., 1979, Clemetson, 1983, Jurk y cols., 2003, Romo y cols., 1999, Takamatsu y cols., 1986, Wang y cols., 2005)
GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$, CD49b/2, VLA-2)	Constitutivamente	Colágeno y laminina	(Elices y Hemler, 1989, Saelman y cols., 1994)
GP IIb/IIIa (CD41/61, αIIbβ_3)	En la activación	Fb, Fn, vWF, Vn, TSP, ADAM15	(Bombeli y cols., 1998, Langer y cols., 2005, Nachman y Leung, 1982)
GPIV (CD36)	En la activación	Colágeno & TSP	(Asch y cols., 1987, Tandon y cols., 1989)
GPV (CD42d)	En la activación	vWF, trombina	(Calverley y cols., 1995, Dong y cols., 1997).
GP VI (CD49)	Constitutivamente, aumento en la activación	Colágeno	(Clemetson y cols., 1982)
P-selectina (CD62P)	En activación	PSGL-1, CD24	(Moore y cols., 1995, Stenberg y cols., 1985)
PSGL-1 (CD162)	Constitutivamente, Aumento en la activación	P-selectina	(Moore y cols., 1995, Hsu-Lin y cols., 1984, Frenette y cols., 2000)
ICAM-2 (CD102)	Constitutivamente	LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$)	(Diacovo y cols., 1996)
PECAM-1 (CD31)	Constitutivamente	PECAM-1 y $\alpha_V\beta_3$	(Albelda y cols., 1991, Dhanjal y cols., 2007)
JAM-A (F11R)	Constitutivamente	JAM-A	(Langer y cols., 2005)
JAM-C	Constitutivamente	JAM-B, JAM-C, Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) y $\alpha_V\beta_2$	(Santoso y cols., 2002)
$\alpha_V\beta_3$ (CD51/61)		Osteospontina, Fb, Fn, Vn, TSP, vWF y PECAM-1	(Bennett y cols., 1997, Columbo y Bochner, 2001, Gawaz, 2004)
VLA-5 (CD49e/29, $\alpha_5\beta_1$)	Constitutivamente	CD40 ligando, Fb, Fn	(Hemler y cols., 1988, Podolnikova y cols., 2003, Ruppert y cols., 1995)
VLA-6 (CD49f, $\alpha_6\beta_4$)		CD40 ligando, Fb, Fn	(Hemler y cols., 1988, Podolnikova y cols., 2003, Ruppert y cols., 1995)

Factor von Willebrand (vWF), Ligando Glicoproteico para la P-selectina (PSGL), Glicoproteína (GP), Fibrinógeno (Fb), Fibronectina (Fn), Vitronectina (Vn), Trombospondina (TSP), Desintegrina (α), Antígeno muy tardío (del inglés: *very late antigen*: VLA), Molécula de adhesión celular endotelio-plaqueta (PECAM), Molécula de adhesión juncional o de unión adherente (JAM), Molécula de adhesión intracelular (ICAM), Grupo de Diferenciación (CD del inglés: *cluster of differentiation*). La nomenclatura CD se propuso en 1982 y sirve para nombrar a moléculas de superficie celular (antígenos), que son reconocidos por ciertos anticuerpos monoclonales (Tabla adaptada de Watkins, 2010).



1.2.2 SISTEMA DE MEMBRANAS INTERNO

La plaqueta tiene un sistema de canales conectados a la superficie llamado el *sistema canalicular abierto* (SCA) y un *sistema tubular denso* (STD), no conectado.

1.2.2.1 Sistema canalicular abierto (SCA)

Corresponde a los canales abiertos al exterior que le dan características de esponja a la plaqueta. A través del SCA (Fig. 2), las sustancias del plasma entran al interior de la plaqueta y salen los productos plaquetarios. La liberación de productos plaquetarios a través del SCA, tras la activación plaquetaria, se llama "*reacción de liberación*". Las membranas son ricas en glicoproteínas, que sirven como receptores de componentes que desencadenan la activación plaquetaria y como sustratos para las reacciones de adherencia y agregación. Los fosfolípidos de la membrana del SCA, son importantes para la coagulación porque proporcionan la superficie sobre la cual reaccionan las proteínas de la coagulación. La membrana también tiene la habilidad de traducir señales de superficie en señales químicas internas (Shapiro, 1999; Díaz-Ricardo, 2000; Patel y cols., 2005).

1.2.2.2 Sistema tubular denso (STD) o Retículo endoplásmico (RE)

Es menos abundante que el SCA y está constituido por unos canales mucho más delgados, amorfos y que no se comunican al exterior (Fig. 2). Constituye el principal reservorio de Ca^{2+} plaquetario y en el que también se alojan enzimas del metabolismo de las prostaglandinas. Además se localiza la actividad peroxidásica, lo que iría a favor de la hipótesis de que el STD sería el retículo endoplasmático liso de la plaqueta. En la activación plaquetaria un paso central imprescindible es el incremento de Ca^{2+} citoplasmático, procedente básicamente de la movilización del mismo desde el STD, y a la inversa la plaqueta puede bombear Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el STD, contribuyendo a mantener controlado su nivel citoplasmático y evitando el cambio de forma y otras respuestas a la activación (Shapiro, 1999; Pujol y cols., 2001).

1.2.3 CITOESQUELETO PLAQUETARIO

El citoesqueleto, es un conjunto de sistemas fibrilares en varios estados de polimerización, que consta de un citoesqueleto de membrana (con filamentos submembranosos) y un citoesqueleto de citoplasma (compuesto por microtúbulos y microfilamentos) (Shapiro, 1999; Pujol y cols., 2001).

El citoesqueleto forma el sostén para el mantenimiento de la forma discoidal de la plaqueta así como del sistema contráctil, que tras la activación, permite el cambio de forma, prolongación pseudopódica, contracción interna, liberación de constituyentes granulares, retracción del coágulo que, en resumen, caracterizan la función de las plaquetas

en la hemostasia. Estos elementos comprenden entre el 30 % al 50 % de la proteína total de la plaqueta (Shapiro, 1999).

1.2.4 GRÁNULOS ESPECÍFICOS

Formado por los gránulos y componentes celulares, tales como lisosomas, microperoxisomas, mitocondrias, ribosomas y aparato de Golgi. Estas zonas sirven en los procesos metabólicos de las plaquetas y almacenan enzimas y una gran variedad de sustancias importantes para la función plaquetaria. Se ha observado que la cinética de secreción de los diversos tipos de gránulos es secuencial, dependiendo de la intensidad de activación plaquetaria (Pujol y cols., 2001).

1.2.4.1 Gránulos α

Son los más numerosos (50 por plaqueta), suelen ser esféricos u ovals limitados por una membrana. Son los principales lugares de almacenamiento de las sustancias destinadas a ser secretadas en las plaquetas activadas. Estas sustancias son factores mitogénicos, proteínas plaquetarias específicas, factores de coagulación, proteínas adhesivas, factores de permeabilidad vascular, inhibidores proteolíticos y factores fibrinolíticos (Shapiro, 1999; Pujol y cols., 2001).

El hecho de que las plaquetas liberen factores de crecimiento, ha hecho que se postulara su papel en la patogénesis de la aterosclerosis, estimulando la proliferación del músculo liso. También liberan colagenasa, enzima que puede modificar la pared vascular. Se ha descrito que las plaquetas poseen un receptor específico para el **factor de crecimiento plaquetario (PDGF)**, que liberan de los gránulos α ; la interacción del PDGF con su receptor plaquetario ejerce una regulación negativa de la respuesta de la célula, ya que inhibe la agregación de las plaquetas con trombina (Vassbotn y cols., 1994). Otra proteína específica muy estudiada, es el **factor plaquetario 4 (PF4)** y la **β -tromboglobulina (β -TG)** ambas con actividad mitogénica y anti-heparina.

Estos gránulos, también contienen, factores proteicos, que podrían participar en el proceso de coagulación sanguínea, y en los procesos adhesivos plaqueta-plaqueta o plaqueta con otras células. El **fibrinógeno, la proacelerina** (factor V de la coagulación) y el **vWF** liberado por las plaquetas, pueden unirse a la superficie plaquetaria y contribuir a los procesos adhesivos plaqueta-plaqueta o plaqueta sub-endotelio (Regañón y cols., 1985; Adams y cols., 1993).

1.2.4.2 Gránulos densos

Poseen una morfología muy característica, una zona central muy densa rodeada por un halo transparente, delimitados por una membrana. Su densidad es debido a la



elevada concentración de Ca^{2+} y **fósforo** que son liberados al medio extracelular por la activación plaquetaria. Estos gránulos, contienen nucleótidos de adenina (**ADP, ATP**), serotonina (**5-HT**), pirofosfato y otros cationes (Pujol y cols., 2001; White, 1998).

La importancia fisiológica que tiene la liberación de ADP, se debe a que induce la estimulación de otras plaquetas en el micro-entorno, favoreciendo lo que se conoce como *reclutamiento plaquetario o del trombo*. El ATP por el contrario, antagoniza la acción agregante del ADP. La serotonina y el ADP liberados, tienen efectos vaso-activos, produciendo contracción en las arterias dañadas. Adicionalmente, la 5-HT tiene un débil efecto pro-agregante sobre las plaquetas, y potencia el efecto de otros inductores de la respuesta plaquetaria (Hilis y cols., 1991).

1.2.4.3 Lisosomas

La fuerte estimulación de las plaquetas (por ejemplo con trombina), produce la liberación de lisosomas plaquetarios. Estos gránulos contienen actividades hidrolíticas y proteolíticas, para destruir la formación del trombo. Otros componentes proteicos importantes desde el punto de vista funcional de la plaqueta son las proteínas que ligan nucleótidos de guanina o proteína G y diversas enzimas: fosfolipasas, quinasas y otros.

1.3 FUNCIÓN PLAQUETARIA

Su principal función es en la **hemostasia**, es decir sirve de soporte endotelial cubriendo los defectos dejados por las células endoteliales en el sistema vascular. Lo realiza adhiriéndose mecánicamente al sub-endotelio y agregándose unas con otras para mantener la continuidad de los vasos. Estos agregados forman una **barrera física** que limita la pérdida de sangre inmediatamente después que se produce la lesión. A su vez las plaquetas liberan sus componentes intra-citoplasmáticos; aumentando la **vasoconstricción** y **amplificando la coagulación**. Además, los fosfolípidos de la membrana plasmática intervienen en la vía intrínseca de la coagulación. También intervienen en la respuesta inmunitaria, especialmente en la **inflamación**: estimulando la cicatrización y la quimiotaxis de leucocitos, fibroblastos y células musculares. El proceso de transformación de plaquetas inactivas en un tampón plaquetario se debe a la adecuada interacción de tres sistemas: la hemostasia primaria, hemostasia secundaria y retracción del coágulo.

1.3.1 HEMOSTASIA PRIMARIA

La activación de las plaquetas desempeña un papel esencial en las respuestas tanto fisiológicas como patológicas, pudiendo ser activadas bajo una amplia variedad de estímulos. Tras producirse una **lesión en el vaso sanguíneo**, se produce una **constricción vascular**, terminando en la formación del **trombo blanco** o **tapón plaquetario**. Para ello,

la plaqueta debe pasar por cuatro fases: cambio de forma, adhesión, secreción y agregación (Sharathkumar y col., 2008).

1.3.1.1 Cambio de forma

Es la primera manifestación física de la activación plaquetaria, es el cambio de forma discoide (Fig. 4A) a esferoide, que se acompaña de un incremento en la superficie desde $8,02 \mu\text{m}^2$ (plaqueta en reposo) a $13 \mu\text{m}^2$ (plaqueta activada). Disminuye la longitud del sub-esqueleto sub-membrana aportando así membranas para este proceso. Este cambio da lugar a la formación de varios pseudópodos finos o filipodios ($0,1 \mu\text{m}$ de diámetro) desde el borde del disco (Fig. 4B) (García Mesa y cols., 2000; Zucker, y cols., 2007). Para que se den estos cambios es importante un notable incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular para la activación de las fibras de actina y miosina (García Mesa y cols., 2000). El segundo paso es el cambio de forma, de disco a una esfera irregular, que esta correlacionado con la fosforilación de la miosina y además en el citoplasma aparece una red de filamentos de actina. El cambio de forma causa que el haz de microtúbulos se tumbe debajo del borde del disco para centralizarse y rodear los gránulos de las plaquetas, los cuales son concentrados en el centro de la misma (Fig. 4C) (Shapiro, 1999; Díaz-Ricardo, 2000). Es un proceso independiente de Ca^{2+} (cuando el estímulo es el ADP) y dependiente de energía (García Mesa y cols., 2000).

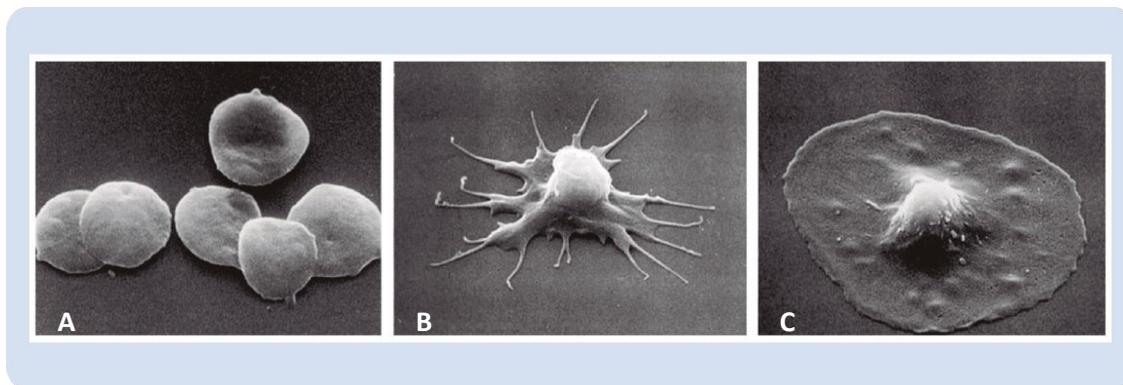


Figura 4: Cambio de forma de las plaquetas durante la coagulación. (A) Forma discoide de la plaqueta, (B) cuando son expuestas a agentes coagulantes las células se asientan en el sustrato y extienden numerosos filipodios, (C) y luego se expanden debido a un reordenamiento del citoesqueleto de actina el cual está unido a la membrana plasmática (Lodish y cols., 2005).

1.3.1.2 Adhesión plaquetaria

Cuando ocurre una lesión en la pared de un vaso, quedan expuestos productos subendoteliales (por ejemplo, colágeno, Factor von Willebrand, fibronectina y laminina) existiendo una serie de interacciones entre receptores de membrana y sus correspondientes ligandos en el sub-endotelio expuesto. En el inicio del proceso de adhesión plaqueta-vaso, juega un papel preponderante el complejo glicoproteico de las plaquetas (**GP Ib/IX**), que

se une al **vWF**, sintetizado por el propio endotelio o circulante en el plasma, que a su vez tiene la capacidad de unirse al sub-endotelio (Sharathkumar y cols., 2008).

También la **GP IV** y el **complejo GP Ia/IIa**, de la membrana plaquetaria, participan en el proceso adhesivo, vía unión al colágeno. Otro complejo glicoproteico, el **IIB/IIIa**, que se expone en la superficie de las plaquetas activadas podría participar en el proceso adhesivo, por su capacidad para interactuar con varias proteínas adhesivas y con el colágeno (Fig. 5) (Nieswardt y cols., 2001; Pereira, 2006).

Una etapa subsiguiente a la adhesión plaqueta-vaso, es la adhesión plaqueta-plaqueta (**cohesión**). En este proceso, que tiene lugar cuando el vaso se ha recubierto de una monocapa de plaquetas, participan otras glicoproteínas de la membrana plaquetaria. Estas incluyen la **GP Ib**, que interacciona con el vWF, la **GP Ic** que interacciona con la fibronectina, y la **GP IV** que interacciona con la trombospondina (Fig. 5) (Marcus y cols., 1993).

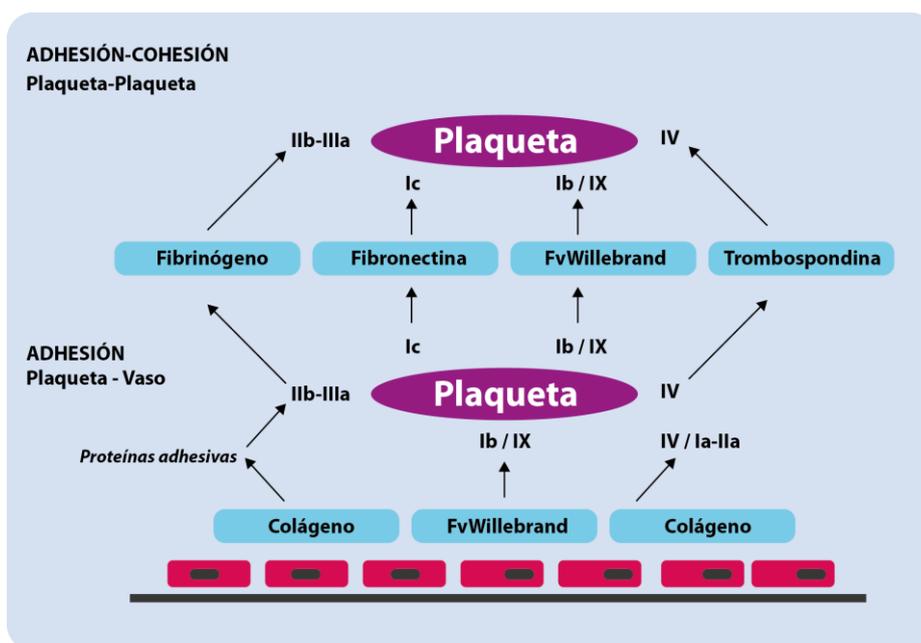


Figura 5: Adhesión y Cohesión Plaquetaria (Adaptado de García Allut, 2000).

1.3.1.3 Agregación plaquetaria

a. Mecanismo de activación

En la sangre o plasma, las plaquetas sin estimular, no interactúan entre ellas y permanecen como células aisladas. La agregación plaquetaria es el resultado de una unión entre plaquetas activadas (Pereira, 2006), y para que tenga lugar es necesario que el inductor

exponga el receptor del fibrinógeno en la plaqueta, y que esta proteína se una al mismo, formando puentes de unión plaqueta-plaqueta.

Un evento que sigue a la activación plaquetaria es el incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, cuyo mecanismo bioquímico no ha sido determinado totalmente en la mayoría de los casos. Con respecto a la ADP, Epinefrina, Trombina, Colágeno y tromboxano A_2 (TXA_2), se ha demostrado que se produce la activación de la **fosfolipasa C (PLC)**, que da lugar a la formación de 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) (que libera Ca^{2+} del sistema tubular denso y activa una miosina kinasa) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Este último activa la **proteína kinasa C (PKC)** que desencadena una serie de fosforilaciones de proteínas, la pleckstrina, que actúa sobre los gránulos α y densos, produciendo la liberación de su contenido, y expresión del receptor (Complejo GP IIb/IIIa) para el fibrinógeno (Shapiro, 1999; White, 1998). El IP_3 activa la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares al citoplasma, lo que activa la **fosfolipasa A_2 citoplasmática (PLA₂)**, que cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y da lugar al **ácido araquidónico (AA)**. Éste se metaboliza preferencialmente con la enzima ciclooxigenasa (CO ó COX) y tromboxano sintasa (TS) para dar lugar al **TXA_2** , que promueve la movilización de Ca^{2+} del sistema tubular denso y también a cambios en la estructura de la glicoproteína IIb/IIIa (Coller, 1986). El TXA_2 no solo es un potente agregante plaquetario, sino también induce vasoconstricción. Otra consecuencia, es inducir la secreción de los gránulos α y densos (TXA_2 , serotonina, ADP), cuyo objetivo es activar nuevas plaquetas (Fig. 6) (White, 1998; Redondo, 2004; García Mesa y cols., 2000; Pereira, 2006). En el caso del TXA_2 se cree que también hay entrada a la célula del Ca^{2+} extracelular a través de una intensificación del intercambio Na^+/H^+ de lo cual depende más de la mitad del incremento del Ca^{2+} citoplasmático (Shapiro, 1999).

Una consecuencia importante de la salida de Ca^{2+} de los depósitos es la facilitación de los mecanismos de externalización del **complejo glicoproteico IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)**, que sirve de receptor para el fibrinógeno, lo cual permite la agregación entre plaquetas a través de puentes compuestos por triadas: GP IIb/IIIa (plaqueta A)-fibrinógeno-GP IIb/IIIa (plaqueta B) (Fig. 6) (Leung y cols., 1986). Ya que los agregados plaquetarios forman un trombo o tapón inestable. Sin embargo a medida que la activación plaquetaria avanza, se produce una mayor contracción del citoesqueleto de las plaquetas que las apiña y hace que tengan una apariencia de fusionadas. Además la trombina, generada localmente, da lugar a la formación de hebras de fibrina que se unen a las plaquetas agregadas, dando lugar a un armazón de fibrina al que se adhieren las masas fusionadas de plaquetas (Guyton y Hall, 2006).

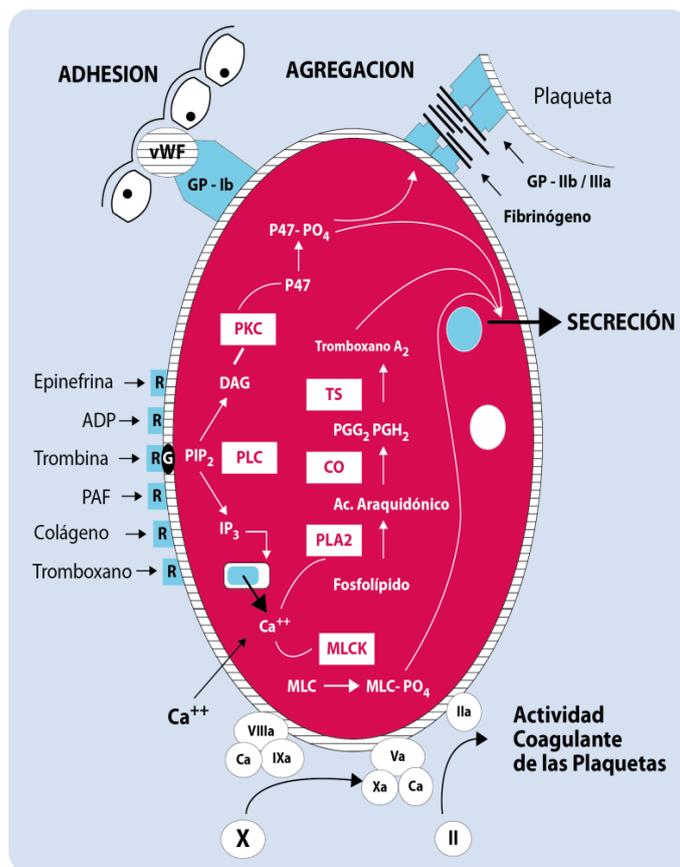


Figura 6: Representación esquemática de la hemostasia primaria. Contacto del colágeno subendotelial por el factor von Willebrand (vWF) con la plaqueta o activación por agonistas (ADP, trombina y otros), favorece la activación de la fosfolipasa C (PLC) y pone en marcha el ciclo del fosfoinositol (vía fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂)), formando al diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP₃). Éste activa la salida de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, entonces el Ca²⁺ estimula a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) la cual libera ácido araquidónico (AA) que a través de la ciclo oxigenasa (CO) y tromboxano sintasa (TS) produce tromboxano A₂ (TXA₂). Esto determina un aumento de Ca²⁺, aumentando la contracción plaquetaria y produciendo la secreción de gránulos α y densos (TXA₂, ADP, Trombina) y la externalización del complejo GP 1Ib/IIIa que sirve de receptor del fibrinógeno y así formar agregados plaquetarios. Por otra parte el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) que también es capaz de regular la secreción de gránulos plaquetarios (White, 1998).

b. Mecanismo de inhibición

Entre los mediadores que evitan que ocurra la adhesión plaquetaria al endotelio está la heparina, que previene la estimulación de los receptores de trombina y las prostaglandinas, que regulan de forma negativa la función de muchas vías de señalización en la plaqueta. La PGE₂ estimula la síntesis de AMPc que activa la proteína quinasa A (PKA), que a su vez fosforila diversas proteínas que conlleva a la reducción de la liberación de Ca²⁺. La activación de la PKA también inhibe la PLC y PLA₂ y la polimerización de actina. Además, debemos destacar el óxido nítrico (NO), producto del metabolismo de los aminoácidos, que estimula la síntesis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), actuando de manera similar al AMPc. De hecho ambos, GMPc y AMPc, trabajan de forma sinérgica regulando la función de las plaquetas (Moore y cols., 2010; Jardin, 2011). También la ciclooxigenasa (CO), actúa a nivel del AA- endotelial y en la PGG₂ derivada del AA-plaquetario formando prostaciclina al elevar los niveles de AMPc. Por último, las células del endotelio vascular expresan en sus membranas CD39, una enzima con actividad ATP difosfohidrolasa que degrada ATP y ADP, reduciendo la capacidad de ambos para estimular las plaquetas (Redondo; 2009; Jardin, 2011).

1.3.1.4 Secreción plaquetaria

Después de un estímulo fuerte, los gránulos α , densos y lisosomiales se alargan y emiten pseudópodos, se aproximan a la membrana plasmática y se funden en ella. Debido a la entrada de agua, aumentan de volumen y esto propicia la liberación de su contenido al medio exterior (ADP, serotonina, fibrinógeno, Ca^{2+} y otros) lo que se denomina secreción. Las sustancias liberada mantienen la activación, atraen y activan otras plaquetas y además intervienen en la coagulación de la sangre (Richardson y cols., 2005).

La secreción se produce ante agonistas fuertes en ausencia de agregación, pero necesita de ésta cuando las plaquetas son activadas con agonistas débiles. La secreción de los gránulos α ocurre con mayor facilidad que los densos y parece contribuir a las interacciones de las plaquetas con otras células como linfocitos y monocitos. Así, el contenido y secreción de los gránulos densos parece dependiente de dos vías: una es la medida por la elevación de los niveles de Ca^{2+} citosólico, la otra por la activación de la PKC que participara fundamentalmente en los procesos de fusión (Zucker, 1999; Díaz-Ricardo, 2000; García Mesa y cols., 2000).

1.3.2 HEMOSTASIA SECUNDARIA

Casi simultáneamente a la formación del tapón plaquetario, se pone en marcha el proceso enzimático que tiene lugar sobre la pared vascular o superficies celulares para dar lugar a la formación del **coágulo sanguíneo** o **trombo rojo**, ya que la agregación plaquetaria en sí misma es temporal (Juan Marco y cols., 2000; Pereira, 2006; Murillo, 2006).

1.3.2.1 Coagulación de la sangre

Este proceso finaliza con la formación de fibrina, que es la transformación de una proteína soluble como el fibrinógeno en una insoluble o fibrina, cuyas redes constituyen la trama del coágulo. En la composición del coágulo participan otros elementos sanguíneos, como plaquetas, hematíes y leucocitos. En la coagulación intervienen una serie de factores, que se llaman Factores de la Coagulación, la tabla 2 recoge los factores más importantes (Guyton y Hall, 2010). Estos factores son proteínas, excepto el Ca^{2+} (Factor IV) y el Factor III (fosfolípidos de la membrana plaquetaria). Los factores proteicos de la coagulación pueden estar en dos formas: inactiva y activa. La forma activa se suele nombrar con el número romano al que se le añade la letra “a”, por ejemplo: IX (forma inactiva), IXa (forma activa).

**Tabla 2: Factores de Coagulación y sus sinónimos.**

Nombre Científico	Nombre Común	Otros Nombres
Factor I	Fibrinógeno	
Factor II	Protrombina	
Factor III	Tromboplastina Tisular	Factor Tisular (TF)
Factor IV	Ca ²⁺	
Factor V	Proacelerina	Factor Labil
Factor VII	Proconvertina	Acelerador de la Conversión de Protrombina Sérica (SPCA)
Factor VIII:C	Factor Antihemolítico	Cofactor plaquetario I
Factor VIII:R	Factor vonWillebrand (vWF)	
Factor IX	Factor de Christmas	Componentes de Tromboplastina Plaquetario
Factor X	Factor Stuart-Power	
Factor XI	Antecedente de Tromboplastina (PTA)	
Factor XII	Factor de Hageman	
Factor XIII	Factor estabilizante de fibrina	
Precalicroína (PK)	Factor Fletcher	
Kimógeno de alto peso molecular (HMWK)	Factor Fitzgerald-Flaujeac-Williams	
	Proteína C y Proteína S	

Los factores proteicos en su forma activa pueden funcionar como proteasas (enzimas proteolíticas) y como cofactores de las proteasas (aumenta la velocidad de las reacciones). Los factores al ser activados, actúan sobre otros activándolos a su vez, dando lugar al modelo de **“la cascada de la coagulación”**, estableciéndose dos vías: la extrínseca y la intrínseca.

En la vía intrínseca, el mecanismo que inicia la coagulación es el contacto de la sangre con las plaquetas activadas o con las fibras de colágeno del sub-endotelio. En esta vía todos los factores requeridos para la coagulación están presentes en la circulación. En la vía extrínseca se requiere un factor extrínseco a la sangre, el **factor tisular (FT)**, también llamado Tromboplastina tisular o Factor III. Este factor es liberado cuando la lesión es grande y afecta a los tejidos que rodean al vaso. Se libera desde las células dañadas de los tejidos que rodean al vaso. La vía extrínseca es más rápida que la vía intrínseca, se produce segundos después de la lesión (Guyton y Hall, 2010). En la figura 7 están representadas ambas vías con las reacciones enzimáticas proteolíticas en cascada.

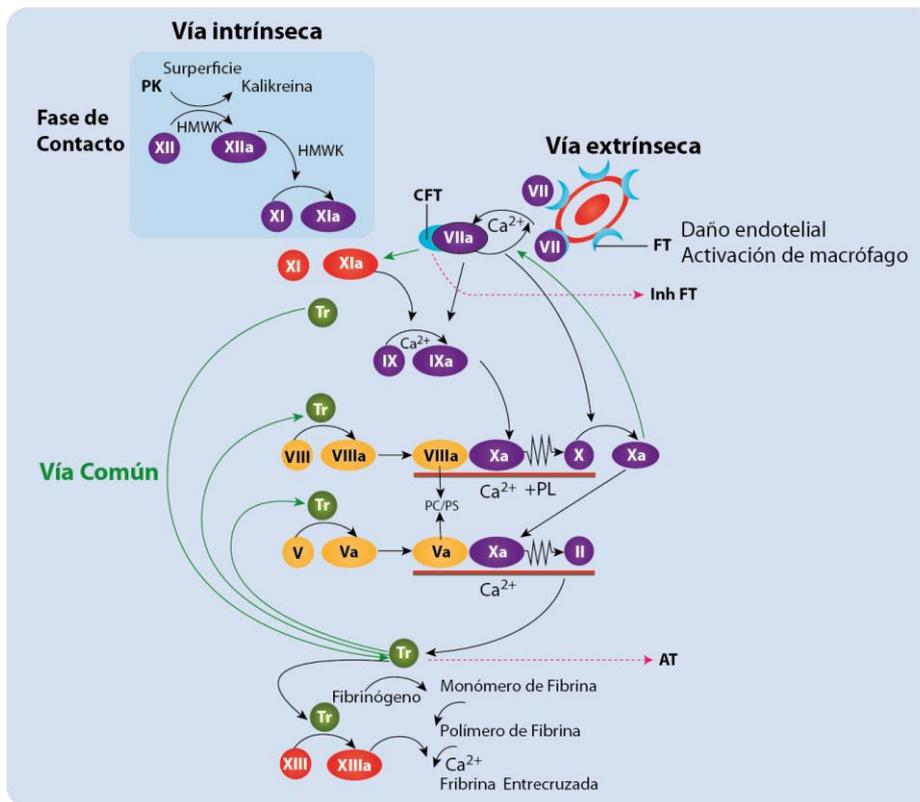


Figura 7: Modelo de la cascada de la coagulación. La **vía intrínseca**, es iniciada cuando se realiza el contacto entre la sangre y superficies expuestas. La **vía extrínseca** es iniciada cuando ocurre la lesión vascular lo cual resulta en una exposición del factor tisular (FT). Las flechas verdes representan el punto de cruce entre ambas vías. Las dos vías convergen en la activación del factor X a Xa. El factor Xa que a su vez activa al VII a VIIa como indica la flecha verde. El factor Xa hidroliza y activa la protrombina (II) a trombina (Tr). La trombina puede por ende activar los factores XI, VIII y V lo que ayuda a que proceda la cascada. Básicamente el papel de la trombina es convertir el fibrinógeno a fibrina y activar el factor XIII a XIIIa. El factor XIIIa se une a polímeros de fibrina y así solidifica el coágulo. Precalicroina (PK), Kininógeno de alto peso molecular (HMWK), Complejo del Factor tisular (CFT), Fosfolípido (PL). Las líneas rosas representan las vías anticoagulantes: inhibidor del FT (inh FT), proteína C y S (PC/PS) y antitrombina (AT) (Obtenido de www.quimbiotec.com).

Sin embargo este modelo en cascada, presenta inconsistencias al trasladarlo a la clínica, lo que llevó a nuevas investigaciones. Actualmente la coagulación se describe a través del modelo celular de Hoffman y cols., que consideran que el proceso de la coagulación no ocurre en cascada, sino que son las superficies celulares, según las propiedades que presenten, las que controlan este proceso. Estos autores han desarrollado un modelo celular que se diferencia en tres fases: la de **iniciación** que ocurre en las células que tienen FT como los fibroblastos y se forma el complejo FT/VIIa, la de **amplificación** donde se activan las plaquetas y los co-factores preparándose para la generación de trombina y por último la de **propagación** en la que se generan grandes cantidades de trombina en las plaquetas activadas. El proceso clave en este modelo es la formación del complejo FT/VIIa (Hoffman y cols., 2001).



El proceso de la coagulación se activa al producirse un daño en un vaso sanguíneo. Los monocitos, neutrófilos y macrófagos son atraídos por el endotelio del vaso dañado al activarse el receptor P-selectina de las células endoteliales y de las plaquetas (Del Conde y cols., 2005).

Los leucocitos desprenden micropartículas que se unen a la membrana de las plaquetas y proporcionan FT que iniciará el proceso de la coagulación (Hoffman y cols., 2001; Del Conde y cols., 2005).

- **Fase de iniciación:** La coagulación tanto en venas como en arterias es desencadenada por el FT que se encuentra en fibroblastos o monocitos. Éste se une al factor VII produciendo factor VIIa. El factor VIIa apenas tiene actividad enzimática por sí solo, es necesario que se una al FT para que la tenga, formando el complejo FT/VIIa. La formación de este complejo es el proceso clave de este modelo. El complejo FT/VIIa activa el factor IX y al X produciendo el factor IXa y el Xa. El factor Xa convierte pequeñas cantidades de protrombina en trombina, que aunque son insuficientes para completar el proceso de formación de la fibrina, tiene un papel fundamental en la activación de las plaquetas en la fase de amplificación (Fig. 8) (Mann y cols., 2005).
- **Fase de amplificación:** Al dañarse el vaso sanguíneo las plaquetas al igual que el plasma entran en contacto con el tejido extravascular. Las pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de iniciación son suficientes para aumentar la adhesión de las plaquetas al tejido celular así como para activarlas. La activación de la plaqueta altera la permeabilidad de la membrana, lo que permite la entrada del Ca^{2+} y la salida de sustancias quimiotácticas que atraen a los factores de la coagulación a su superficie y, simultáneamente, se liberan el factor V y los fosfolípidos necesarios para la coagulación. Los factores activados en esta fase son el factor V, el VIII y el XI. Por tanto, en esta fase se producen plaquetas activadas, factor Va, VIIIa, XIa. Este paso es muy importante para que continúe la propagación de la coagulación ya estos componentes activados son fundamentales (Fig. 8) (Pérez-Gómez y cols., 2007).
- **Fase de propagación:** Para la coagulación son necesarios los factores IXa y Xa. El factor IXa, en presencia de Ca^{2+} , se une al factor VIIIa en la superficie de las plaquetas activadas, formando un complejo que también cataliza la formación del factor Xa en grandes cantidades. Este factor Xa, en presencia de Ca^{2+} , se une al factor Va en la superficie activada de la plaqueta para formar el complejo protrombínico. Este complejo protrombínico activa la protrombina formando gran cantidad de trombina al separarse de la superficie de la plaqueta y será suficiente para la formación del coágulo. Esta trombina hace que el fibrinógeno se convierta en monómeros de fibrina y se active el factor XIII (Furie y cols., 1992). El fibrinógeno es una glicoproteína formada por un dímero de tres cadenas polipeptídicas. La trombina arranca el radical amino de las cadenas α y β liberando

los fibrinopéptidos A y B, convirtiendo de este modo el fibrinógeno en monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina se polimerizan formando protofibrillas. El factor XIIIa se entrecruza con las fibrillas haciendo que se solidifique el coágulo (Fig. 8) (Becker y cols., 2006).

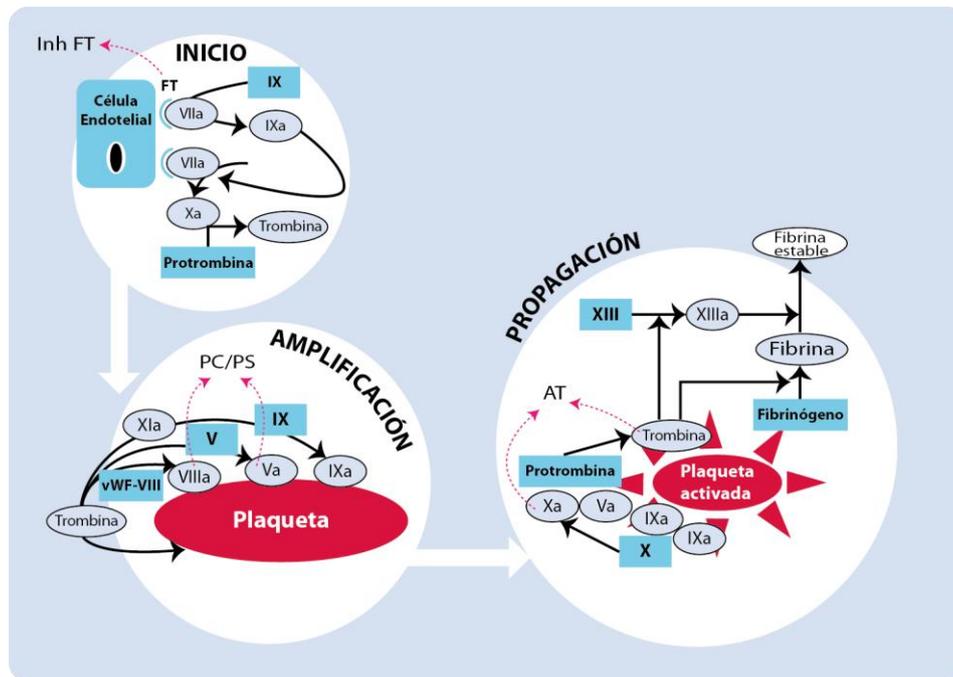


Figura 8: Modelo celular de la coagulación. Las tres fases de la coagulación ocurren en superficies celulares: la **iniciación** se produce en células que contienen factor tisular (FT) como fibroblastos o monocitos; la **amplificación**, fase en la que se activan los cofactores y las plaquetas y la **propagación** ocurre en la superficie de las plaquetas activadas. (vWF). Las líneas rosas representan las vías anticoagulantes: inhibidor del FT (inh FT), proteína C y S (PC/PS) y antitrombina (AT) (Adaptación de Hoffman y cols., 2001).

Existen diferentes mecanismos que limitan la cascada de la coagulación al sitio de la lesión: 1) el flujo sanguíneo normal, que arrastra factores activados; 2) el hígado actúa como filtro quitando de la sangre dichos factores activados; 3) proteasas que degradan ciertos factores activados y otras que inhiben. La **proteína C**, cuya síntesis se da en el hígado y es dependiente de la vitamina K, se activa al unirse con la **trombomodulina**, actuando específicamente en la degradación de los factores Va y VIIIa, con lo que limita la proyección de la cascada. La **antitrombina III**, también sintetizada en el hígado, pero que no es dependiente de la vitamina K, es la principal inhibidora. Es una proteína que actúa inhibiendo irreversiblemente a varios factores pro-coagulantes activos, sobre todo la trombina, pero también la kalicreína y los factores IXa, Xa, XIa, y XIIa. La acción de la antitrombina es aumentada por el heteropolisacárido **heparina**, que se encuentra en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los gránulos de las células cebadas (Fig. 8) (Robbins y cols., 2009).



1.3.3 RETRACCIÓN DEL COÁGULO y FIBRINÓLISIS

La lisis del coágulo comienza inmediatamente después de la formación del coágulo de fibrina. Cuando se forma el coágulo, se atrapa una gran cantidad de plasminógeno en todo el coágulo junto a otras proteínas del plasma. Los tejidos dañados y el endotelio vascular liberan muy lentamente un activador poderoso llamado **activador del plasminógeno tisular** (t-PA) que unos pocos días más tarde, después de que el coágulo haya detenido la hemorragia, convierte finalmente el plasminógeno en plasmina, de intensa actividad proteolítica y capacitada para digerir los anillos de fibrina, digerir el fibrinógeno y desactivar otros factores de la coagulación (V, VIII). Al romper la fibrina se forman fragmentos solubles de tamaño pequeño, son los productos de degradación de la fibrina (PDF) (Guyton & Hall, 2010).

2. EL IÓN Ca^{2+}

2.1 MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+}

2.1.1 ALMACENES DE Ca^{2+} PLAQUETARIO

2.1.2 MECANISMOS QUE PRODUCEN UN AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN CITOPASMÁTICA DE Ca^{2+}

2.1.3 MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE Ca^{2+} DEL CITOPLASMA CELULAR

2.2 HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN LAS PLAQUETAS

2. EL IÓN Ca^{2+}

2.1 MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+}

El ión Ca^{2+} es uno de los mensajeros intracelulares más importantes de los descritos hasta ahora, porque está implicado en una larga lista de procesos celulares y fisiológicos (Redondo, 2004). Al contrario que otros segundos mensajeros, el Ca^{2+} , como la energía, no se crea ni se destruye en la célula sino que simplemente se transporta desde el exterior extracelular o depósitos intracelulares hasta aquellos lugares donde se localizan los múltiples efectores del Ca^{2+} , es decir la señal de Ca^{2+} es, en primer lugar, una cuestión de transporte.

Cuando las plaquetas están en reposo, la membrana citoplasmática es relativamente impermeable al Ca^{2+} , encontrándose éste en una concentración extracelular 10.000 veces superior a la intracelular. La concentración de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (RE) es del orden de los milimolares, aunque en el citosol sea apenas de 100 nM, lo que se traduce en una distribución intracelular no homogénea. Este gran gradiente químico, junto al potencial negativo del interior celular, hace que exista un enorme gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} a través de canales específicos (Fox y cols., 1987; Salzman y cols., 1989).

Existen múltiples tipos de canales de Ca^{2+} caracterizados por su mecanismo de activación (“gating”) bien por voltaje, unión de ligandos extracelulares o intracelulares. La activación celular por hormonas u otros ligandos, induce generalmente un cambio bifásico en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A una primera fase transitoria debida a liberación intracelular de Ca^{2+} inducida por IP_3 le sigue otra fase mantenida, frecuentemente asociada a oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, debida a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Villalobos, 2005). Putney en 1986, propuso que la entrada de Ca^{2+} extracelular estaba activada precisamente por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Hoy día, este mecanismo de acción, al que se denominó **entrada capacitativa de Ca^{2+}** (ECC), es considerada la vía más importante de entrada de Ca^{2+} en las células no excitables (como las plaquetas), aunque también participa en las células excitables (neuronas, miocitos y células endocrinas), donde regula numerosas funciones celulares (Putney, 1986; Villalobos, 2005).

A continuación, se exponen los principales mecanismos y vías conocidas de la movilización del Ca^{2+} .

2.1.1 ALMACENES DE Ca^{2+} PLAQUETARIO

El mayor almacén de Ca^{2+} en la mayoría de los tipos celulares es el STD ó RE. Pero otros orgánulos, también contienen altas concentraciones de Ca^{2+} y actúan como compartimentos liberadores de Ca^{2+} frente a un agonista; éstos incluyen a la mitocondria y a las organelas ácidas (Juska y cols., 2008). Así, en las plaquetas hay dos tipos de almacenes de Ca^{2+} : el **STD**, que es análogo al RE y los **almacenes ácidos** (López y cols., 2005; López y cols., 2006). El **STD** expresa una bomba transportadora de Ca^{2+} , denominada *ATPasa-transportadora de Ca^{2+}* (ATPasa- Ca^{2+}) del retículo sarco(endo)plasmático o **SERCA**. En las plaquetas se expresa la isoforma SERCA2b, que tiene alta sensibilidad a la tapsigargina (TG). Los **almacenes ácidos** (lisosomas y gránulos de secreción), contienen la isoforma SERCA3 (Fig. 9), con una baja afinidad a la TG y sensible a la 2,5-di-terbutilhidroquinona (TBHQ). La TG y la TBHQ, son los inhibidores más específicos de la SERCA y son usados para investigar su papel en la regulación del Ca^{2+} citoplasmático, impidiendo que se bombee Ca^{2+} al interior de estos almacenes (Jardin y cols., 2008).

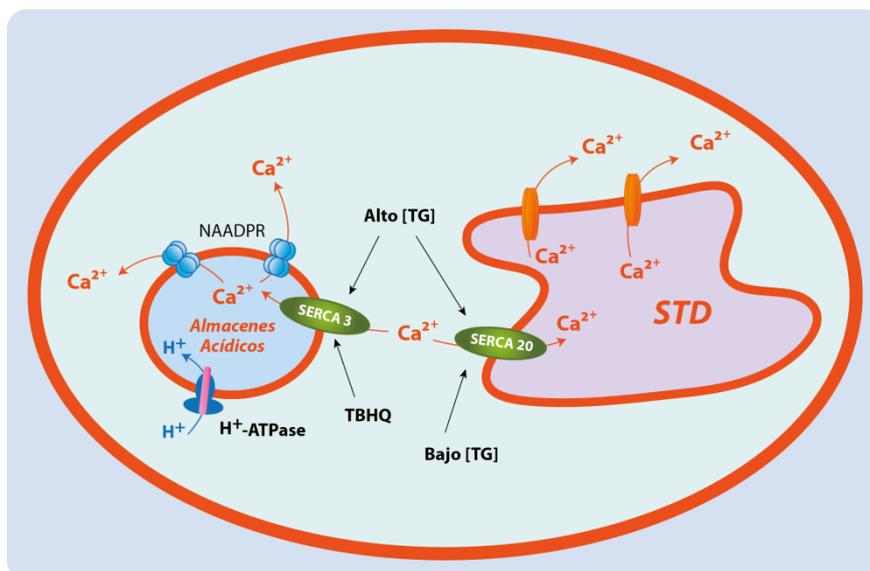


Figura 9: Representación esquemática de los dos tipos de almacenes de Ca^{2+} y las vías de flujo de Ca^{2+} . El sistema tubular denso (STD) expresa la isoforma SERCA2b con alta sensibilidad a la tapsigargina (TG) y los depósitos ácidos, contienen al SERCA3, una isoforma con baja afinidad a la TG y sensible al ácido ciclopiazónico y la 2,5-di(ter-butil)-1,4,-hidroquinona (TBHQ). Los agonistas liberan Ca^{2+} de los almacenes y la H^+ -ATPasa genera un gradiente de protones a través de la membrana organelar de los depósitos ácidos. La liberación del Ca^{2+} del STD se da a través de la producción de IP_3 - IP_3 receptor (IP_3R), receptor NAADP (NAADPR) (adaptado de Juska y cols., 2008; Jardin y cols., 2008).

2.1.2 MECANISMOS QUE PRODUCEN UN AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN CITOPLASMÁTICA DE Ca^{2+}

2.1.2.1 Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

Se produce por la apertura de canales situados en sus membranas y son de diferentes tipos:

- ***Receptor inositol trifosfato ($\text{IP}_3\text{-R}$):*** El IP_3 promueve la liberación del Ca^{2+} secuestrado en el STD, llevando al aumento de la concentración citosólica de este catión. El mecanismo de movilización del Ca^{2+} implica la unión del IP_3 a un receptor específico ($\text{IP}_3\text{-R}$) en la membrana del STD. El IP_3 es generado cuando se activa la **fosfolipasa C** por medio de la subunidad α de la **proteína G** acoplada a un receptor (Fig. 9-10) (Quiton & Dean, 1996; Redondo, 2004). Se han descrito diferentes tipos de IP_3R , las isoformas 1, 2 y 3, que tienen diferente ubicación dentro de las plaquetas. La isoforma 1 y 2 son las más abundantes en él y la isoforma 3 se encuentra en forma exclusiva en la membrana plasmática, de manera que cuando el canal se abre, deja entrar Ca^{2+} desde el exterior. La acción de IP_3 es modulada por el pH, cationes monovalentes, otros cationes divalentes y el trifosfato de guanidina (GTP). El aumento del pH que acompaña la activación de las plaquetas, incrementa drásticamente la unión del IP_3 a su receptor. El papel del Ca^{2+} en la regulación de la actividad del canal es doble, ya que a bajas concentraciones (100-300 nM) estimula su apertura, mientras que tras el estímulo del mismo con el IP_3 , a altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico reducen su actividad hasta llegar a inhibirla por completo. Estos canales también pueden estar regulados por la acción de proteínas, como las **tirosinas kinasas** dependientes de AMPc y GMPc (El-Daher y cols., 1996; Redondo, 2004).
- ***Receptor de la rianodina (RyR):*** Se sitúa en la membrana nuclear interna y en el STD, existen tres isoformas para este canal y juega un rol similar al IP_3 en la liberación del Ca^{2+} . Estos canales están regulados por varias señales químicas, es decir modulados por diferentes sustancias como la rianodina, Ca^{2+} , ATP, cafeína y ADPribosa (McPherson y Campbell, 1993; Ozawea, 1999; Rosado y cols, 2004).
- ***Receptor del ácido nicotínico-adenin dinucleótido fosfato (NAADP-R):*** El NAADP, es sintetizado por la propia célula en el interior de la mitocondria, es un potente regulador de los niveles de Ca^{2+} citosólico, provocando la liberación desde los depósitos intracelulares a través de un canal que es distinto de los que son sensibles a rianodina e IP_3 . A pesar de esta clara distinción, el uso de tres mensajeros intracelulares distintos, permite a las células aumentar su repertorio de disposición Ca^{2+} para codificar los mensajes intracelulares. Una característica de los canales de Ca^{2+} sensibles a NAADP es su localización funcional en



organelas de reservas (depósitos ácidos, como lisosomas), por lo tanto el NAADP también movilizaría el Ca^{2+} a partir de estos depósitos (Fig. 9) (Lee y cols., 1995; Ganazzani y cols., 1996; Churchil y cols., 2002; Patel y cols., 2010), y desde el interior del núcleo a través de la envoltura nuclear al STD (Gerasimenko, 2004). Los últimos estudios mantienen la hipótesis de que el NAADP podría estar unido a proteínas, posiblemente a proteínas de membrana, ya que esto explicaría la aparente heterogeneidad de los almacenes de Ca^{2+} que el NAADP aparentemente descarga (Galioni y cols., 2005).

- **Receptor de esfingosina 1-fosfato (S1P-R):** Esta molécula es un segundo mensajero que libera Ca^{2+} del RE, a través de un canal permeable al Ca^{2+} , posiblemente por la unión a un esfingolípido liberador de Ca^{2+} presente en la membrana del RE (Mao y cols., 1996; Yatomi y cols., 1997). Por otra parte este lípido puede activar los receptores de rianodina, ya que la esfingosina 1-fosfato aumenta la unión de la rianodina a su receptor y la liberación de Ca^{2+} es impedida por los bloqueadores del receptor de rianodina (Rosado, 2004).
- **Proteínas secuestradoras de Ca^{2+} en el interior de los almacenes:** Permiten que existan diferencia de concentraciones entre ambas partes de la célula sin que afecte a la integridad celular, ya sea secuestrando o liberando Ca^{2+} . Entre las proteínas que liberan Ca^{2+} están la calreticulina y calsecuestrina (Camacho y cols., 1995). Otras como la calnexina y la familia de las proteínas sensibles a shock térmico (HSP) son capaces de retener Ca^{2+} en el interior del citoplasma (Redondo, 2004).

2.1.2.2 Entrada de Ca^{2+} desde el exterior

El Ca^{2+} liberado de los depósitos intracelulares a veces resulta insuficiente para llevar a cabo una activación completa de los mecanismos celulares, o para que una vez finalizados los estímulos, las células puedan rellenar sus depósitos. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior puede ocurrir gracias a la apertura de los siguientes canales:

- **Canales operados por voltaje (VOC):** En células excitables, la entrada de Ca^{2+} se da por la apertura de canales que son activados por voltaje, por lo tanto, sucede muy brevemente, ya que durante la transmisión del potencial de acción, el movimiento de cargas de un lado y otro de la membrana, induce el cambio conformacional del canal, adoptando un estado abierto transitorio, de modo que el Ca^{2+} puede entrar a favor de gradiente (Fig. 10) (McCleskey, 1994; Redondo, 2004; Parekh & Putney, 2005).
- **Canales operados por receptores (ROC):** Pueden ser activados por diferentes tipos de moléculas (acetilcolina, glutamato, ATP y ADP) y algunos agonistas celulares. La apertura de este tipo es muy rápida, se produce cuando hay una unión entre el receptor y el canal, o mediante unos sistemas de proteínas

acopladas a los receptores. En plaquetas se ha visto que este canal se activa cuando es estimulado por ADP (Fig. 10) (Sage, 1992; Rosado y cols., 2004).

- **Canales operados por segundos mensajeros (SMOC):** La entrada de Ca^{2+} se debe a la unión de segundos mensajeros al canal, tales como el IP_3 , el Ca^{2+} o DAG, que producirán su apertura. Además de haber sido descrito principalmente en plaquetas, también las células endoteliales y algunos modelos de células excitables presentan este tipo de activación (Fig. 10) (Ma y cols., 2001; Parekh & Putney, 2005).
- **Canales operados por almacenes (SOC):** Son activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares del retículo endoplasmático y mitocondrias (Fig. 10 A y B). Se ha propuesto como el principal canal en células no excitables, como las plaquetas, para la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Varga-Szabo y cols., 2008).

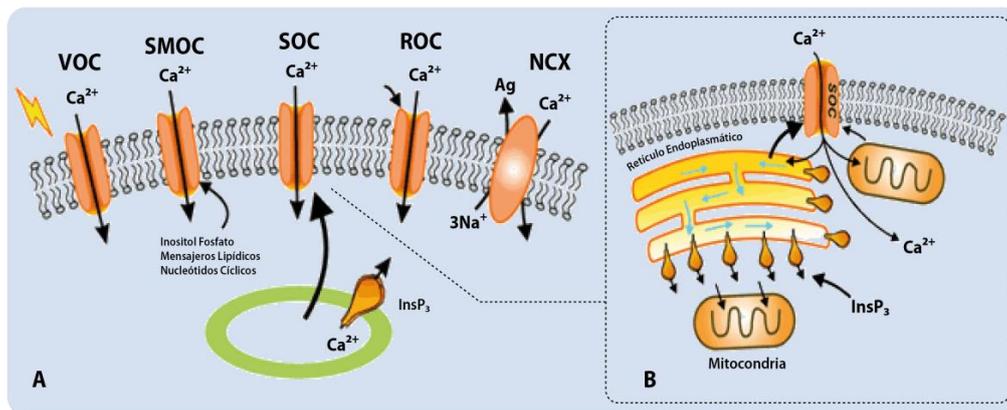


Figura 10: Modelos que regulan la entrada de Ca^{2+} a través de la Membrana Plasmática. (A) El Ca^{2+} puede entrar en la célula por varias clases de canales: Canales operados por voltaje (VOC): se abren por la despolarización de la membrana; Canales operados por segundos mensajeros (SMOC): activados por mensajeros moleculares, el más común el IP_3 , nucleótido cíclicos y mensajeros de derivados lipídicos (como el DAG, Acido Araquidónico); Canales operados por receptor (ROC): activados por unión directa de un agonista. En adición y bajo algunas condiciones el Ca^{2+} puede entrar por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) operado en modo reverso y, (B) Canales operados por almacenes, (SOC: del inglés *store-operated channels*): activados por una señal (como el IP_3) de un compartimento especializado del RE y mitocondria, la depleción de estos almacenes intracelulares de Ca^{2+} produce su apertura (Parekh y Putney, 2005).

2.1.2.3 Entrada capacitativa del Ca^{2+} (ECC)

Es el mayor mecanismo de flujo de Ca^{2+} en células no excitables y es el mecanismo que comunica los almacenes de Ca^{2+} con los canales de la membrana plasmática (MP) (Jardin y cols., 2008). Este modelo se basa en el vaciamiento de los depósitos intracelulares, produciendo una señal que abre canales en la membrana plasmática, lo que induce el aumento de Ca^{2+} citosólico y el relleno de los depósitos que a su vez cierra los canales de Ca^{2+} . Es decir la estimulación celular induce la entrada de Ca^{2+} de un modo indirecto. De este modo, la señal que abre los canales de Ca^{2+} no es la activación del receptor ni la



generación de IP_3 , *per se*, sino el propio vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} (Villalobos, 2006). Este modelo se denominó posteriormente **entrada de Ca^{2+} regulada o mediada por los almacenes** (del inglés: *store operated calcium entry*, *SOCE* o *SMCE* o *ECC*) (Redondo, 2004).

Numerosas estrategias permiten llenar los depósitos de Ca^{2+} de un modo independiente de receptor IP_3 , activando la ECC. Por ejemplo, los bloqueantes de la bomba de Ca^{2+} específica del retículo (Tapsigargina, Ácido ciclopiazónico), ionóforos (Ionomicina) o la simple incubación en medio libre de Ca^{2+} y diálisis con tampones de Ca^{2+} . Posteriormente, se descubrió en mastocitos y otros tipos celulares, que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} inducía la aparición de una corriente de Ca^{2+} completamente nueva que se denominó Icrac (de Ca^{2+} -*release activated current*) (Hoth y cols., 1992). Según este modelo la activación de los canales del IP_3 produce la liberación masiva de Ca^{2+} provocando una corriente de despolarización que solo finalizaba cuando se abrían los canales (Icrac) de la membrana que presentaban una gran selectividad por el Ca^{2+} . Se estima que la selectividad de este canal por el Ca^{2+} respecto a Na^+ es 1000:1, similar a la de los VOCCs y que podría haber al menos 5.000 canales funcionales por célula. Icrac no es la única corriente descrita que se activa por el vaciamiento de los depósitos intracelulares, como ya habíamos mencionado, los canales operados por almacenes (SOC) también juegan un papel importante, pero presentan propiedades electrofisiológicas diferentes, lo que sugiere que la ECC está mediada por una familia de canales más que por un único canal.

Redondo y cols., en el 2004 observaron que la proteína de la familia SNAP-25 (del inglés: *Synaptosomal-Associated-Protein*) y SNARE (receptor del SNAP), participa en la activación y mantenimiento de la ECC en plaquetas humanas. Y que las especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2 , poseen un papel dual sobre la activación y mantenimiento de la ECC dependiendo de la dosis (a dosis altas produce una fuerte inhibición y a dosis bajas un incremento en dicho mecanismo). Esto se debe a que el H_2O_2 induce la polimerización del citoesqueleto de actina por activación de la proteína tirosina-quinasa (p60src), activando la ECC. La remodelación de estos filamentos de actina podría proporcionar un soporte para el transporte de Ca^{2+} a los almacenes, al permitir el acoplamiento de IP_3 a otro receptor (hTRPC1: *potencial receptor canónico humano 1*) (Fig. 10). (Ben-Amor y cols., 2006).

La molécula de interacción estromal 1 (STIM1), que es una proteína transmembrana principalmente localizada en la membrana de los almacenes de Ca^{2+} (en el RE), ha sido recientemente identificada como un sensor intra-luminal de Ca^{2+} que comunica la cantidad de Ca^{2+} almacenado a los canales de la membrana plasmática (Galán y cols., 2009). Además de la expresión del STIM1, diferentes moléculas, tales como el Orai1 y varias isoformas del TRPC (receptor canónico de potencial transitorio), han demostrado jugar un rol importante en la formación de canales SOC (Jardín y cols., 2011). En plaquetas humanas, el STIM1 interactúa con la isoforma hTRPC1 y Orai1 tras la depleción de los almacenes y estimulación por agonistas, formando el complejo SOC, para la entrada de Ca^{2+} a la célula. Por lo tanto, estas proteínas son importantes para la agregación plaquetaria (estimuladas con ADP y Trombina) (Fig. 11) y van a ser mediadores de la regulación de la entrada de Ca^{2+} . Tanto es así, que Galán y colaboradores apuntan que la inhibición de la señalización

dependiente de STIM, Orai1 y hTRPC, puede ser una nueva estrategia para prevenir o tratar la hiperactividad plaquetaria y desórdenes trombóticos (Galán y cols., 2009).

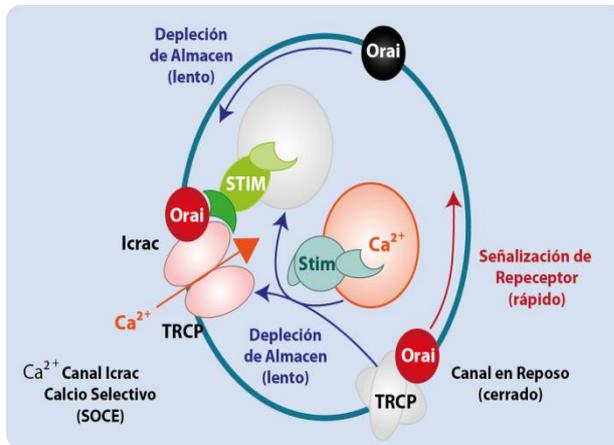


Figura 11: Modelo de la interacción entre hTRPC, Orai y STIM1 en plaquetas. En reposo el TRPC es estabilizado por su interacción con Orai. Tras un estímulo, la disociación rápida del Orai con TRPC, activa el TRPC y produce la depleción de Ca^{2+} de los almacenes, lo que disocia el Ca^{2+} del STIM intraluminal y se forman uniones STIM-Orai. El TRPC se une al complejo Orai-STIM y estabiliza su conformación en un estado en el cual opera como un canal Icrac (adaptado de Liao y cols., 2007).

En contraste, cuando se bloquea experimentalmente la comunicación entre STIM y el complejo Orai1-hTRPC, se forman canales hTRPC. A través de estos canales se produce una entrada “no capacitativa”, tal vez porque se forman complejos heteroméricos con otras subunidades de hTRPC activadas (Jardín y cols., 2011).

2.1.3 MECANISMOS DE ELIMINACIÓN DE Ca^{2+} DEL CITOPLASMA CELULAR

2.1.3.1 Recaptación de la SERCA

El Ca^{2+} citosólico es nuevamente “reintroducido” al RE, mediante la actuación de una la bomba denominada *ATPasas transportadoras de Ca^{2+}* (Ca^{2+} -ATPasa) **del retículo sarco(endo)plasmático** o **SERCA** (Fig. 9), la cual tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} ; capaz de transportar 2 iones de Ca^{2+} desde el citoplasma al lumen de esos compartimentos utilizando la energía de hidrólisis del ATP en presencia de Mg^{2+} . También tiene la propiedad de actuar como una bomba electrogénica en relación 1 Ca^{2+} /1 H^+ (Inesi, 1972; Carafolli, 1992; Redondo, 2004; Sepúlveda Justo, 2006).

La SERCA se aisló por primera vez del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. Es una proteína integrada en la membrana del STD o RE. Se han identificado 7 isoformas de SERCA, siendo la 3 y derivados de sus genes: SERCA3 h3b, SERCA3 h3c, SERCA3 h3d, SERCA3 H3e, SERCA3 h3b/c; las más importantes en plaquetas (Maclennan, 1970).

Existen diferentes moduladores de SERCA, como el fosfolamban, que inhibe su actividad reduciendo su afinidad por el Ca^{2+} ; el fosfolamban es inhibido por PKA y la



calmodulina cinasa, que son proteínas de membrana del retículo endoplásmico, donde actúan como inhibidores reversibles (James y cols., 1989; Sepúlveda Justo, 2006). También puede estar inhibida por agentes farmacológicos como, la tapsigargina (TG) y el ácido ciclopiazónico y la 2,5-di(ter-butil)-1,4,-hidroquinona (TBHQ) (Cavallini y cols., 1995).

2.1.3.2 Eliminación de Ca^{2+} al medio extracelular

Se produce mediante dos mecanismos diferentes:

- **Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA):** La bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática o PMCA, ayuda a que la célula pueda recuperar la concentración de Ca^{2+} basal, mediante su expulsión desde el citoplasma al exterior celular. Utiliza la energía de hidrólisis del ATP en presencia de Mg^{2+} por un mecanismo de reacción similar al SERCA. Esta bomba es el único transportador de Ca^{2+} de alta afinidad de la membrana plasmática, por lo tanto no solo interviene en la regulación global, sino también realizando un fino ajuste de concentración de Ca^{2+} en eventos próximos a la ventana (Salvador y cols., 1998; Sepúlveda, 2006).

Para este tipo de transportador se han descrito hasta 4 isoformas, siendo la PMCA 4, la proteína más expresada en las plaquetas (Rosado y cols., 2010). La actividad de la bomba se ve controlada por mensajeros secundarios como la Ca^{2+} -calmodulina, la tirosina kinasa, la proteína serina-treonina cinasas y por proteasas como la calpaina, haciendo que la PMCA aumente su afinidad por el Ca^{2+} (Fig. 12). El vanadato es un inhibidor específico de la PMCA, sobre todo a concentraciones menores a 10 μM (James y cols., 1989; Strehler y Zacharias, 2001; Sepúlveda, 2006).

- **Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX):** Es un transportador bidireccional situado en la membrana plasmática, produce la expulsión del Ca^{2+} por el movimiento del Na^+ en sentido contrario, es decir que depende de los gradientes electroquímicos para estos dos iones y del potencial de membrana. La estequiometría usual es de 3 ó 4 iones de Na^+ por 1 de Ca^{2+} ; teniendo una baja afinidad por el Ca^{2+} , pero con una capacidad de transporte muy alta. Se han descrito tres isoformas diferentes de esta bomba, diferenciadas entre sí por su regulación a través del ión potasio (Fig. 12) (Philipson y cols., 2002; Sánchez y cols., 2010).

2.1.3.3 Recaptación de Ca^{2+} por la mitocondria

Cerca del 25% del Ca^{2+} intracelular está almacenado en las mitocondrias. Están localizadas en las proximidades de los canales que liberan Ca^{2+} , secuestrando parte del Ca^{2+} liberado desde los almacenes sensibles a los agonistas y luego liberándolo lentamente, una vez que la estimulación del estímulo ha terminado (Bootman y cols., 2002;

Villalobos, 2005). Existen numerosos estudios sobre la importancia de la mitocondria en la homeostasis del Ca^{2+} en diferentes tipos celulares, pero en las plaquetas no está definitivamente establecido, y parece que no tienen una función relevante en la ECC plaquetaria, posiblemente debido a su escasa abundancia (unas 7 mitocondrias por plaqueta) (Beutler y Williams, 2001; Jardín, 2011).

2.1.3.4 Recaptación de Ca^{2+} por proteínas

La concentración de Ca^{2+} citoplasmático también puede ser regulada por proteínas que se encuentran en el citoplasma, al igual que en el retículo endoplasmático, la mayoría actúa como tampones de la concentración de Ca^{2+} intracelular, manteniendo su concentración muy baja en situaciones de reposo, de modo que mantienen un equilibrio entre el Ca^{2+} libre y el unido a proteínas. Entre estas proteínas encontramos la calretinina, calbindina, calmodulina y parvalbumina (Mogami y cols., 1999; Rosado y cols., 2004). Experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron que la expresión de la calmodulina estaba aumentado en plaquetas de ratas con cirrosis biliar y que esto podría estar relacionado con la mayor producción de NO (Iyu, 2005).

2.2 HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN LAS PLAQUETAS

Como habíamos mencionado anteriormente, las plaquetas poseen varios compartimentos intracelulares que almacenan Ca^{2+} , siendo el STD y los almacenes ácidos los mejor estudiados. Estos reservorios presentan distinta sensibilidad al vaciamiento estimulado por agonistas, de tal manera que el vaciamiento del STD esta principalmente mediado por la activación de receptores de membrana acoplados a proteína G, que activan la PLC y la síntesis del IP_3 , mientras que en los depósitos ácidos el vaciamiento esta mediado por la producción de NAADP y su interacción con su receptor en la membrana de estos gránulos (Zhu y cols., 2010; Jardín, 2011). Por ejemplo, la trombina activa los receptores PAR1, PAR4 y la GP Ib/IX/V, de los cuales PAR1 y PAR4 liberan Ca^{2+} del STD y tendrá alguna acción pero pequeña sobre los almacenes ácidos, y la GP Ib/IX/V actúa sobre los gránulos ácidos.

Pero la agregación no solo se va a producir por el vaciamiento de los almacenes, sino cuando se alcanza una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ determinada (Jardín y cols., 2007; Jardín, 2011). Para alcanzar la concentración necesaria de Ca^{2+} para la activación de la agregación, las plaquetas presentan distintos mecanismos, que permite la entrada de Ca^{2+} a la célula: son los canales ROC, SMOC y SOC. El canal ROC, uno de los más estudiados presenta un receptor P2X_1 que es activado por ATP, que permite la entrada de Ca^{2+} y Na^+ . Además, está la activación de canales de Ca^{2+} por segundos mensajeros, como por ejemplo el DAG (un producto de la hidrólisis del PIP_2) que interactúa formando el complejo calDAG-GEF/RasGRP. Sin embargo, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} más importante es la ECC y sus canales SOC, requiere la participación de STIM1, los canales SOC, Orai y distintos

miembros de la familia TRPC, los receptores de IP_3 y SERCA (Redondo y cols., 2008; Salido y cols., 2011; Jardín, 2011). Este mecanismo está soportado por el citoesqueleto y se realiza en lugares específicos de la membrana que poseen un alto contenido de colesterol, que favorece la interacción entre proteínas.

La maquinaria enzimática necesaria para la reducción de la $[Ca^{2+}]_c$ consta de las bombas SERCA2b (del STD), SERCA3 (de los gránulos ácidos), que reintroduce Ca^{2+} dentro de los almacenes y la PMCA en la membrana plasmática, que extrae el Ca^{2+} hacia el exterior. Además, el NCX, colabora con la expulsión de Ca^{2+} hacia el exterior celular intercambiando Ca^{2+} por Na^+ . El efecto sobre la $[Ca^{2+}]_c$ varía según el tipo de agonista plaquetario; por ejemplo, con trombina, la entrada de Ca^{2+} es de un 10-20 % del total de la respuesta; sin embargo, con ADP, la reducción de la entrada de Ca^{2+} reduce la agregación de forma casi completa. Así, el bloqueo de la interacción entre STIM1 y los canales SOC, inhibe completamente la agregación inducida por ADP y reduce la inducida por trombina (Fig. 12) (Galán y cols., 2009; Jardín, 2011).

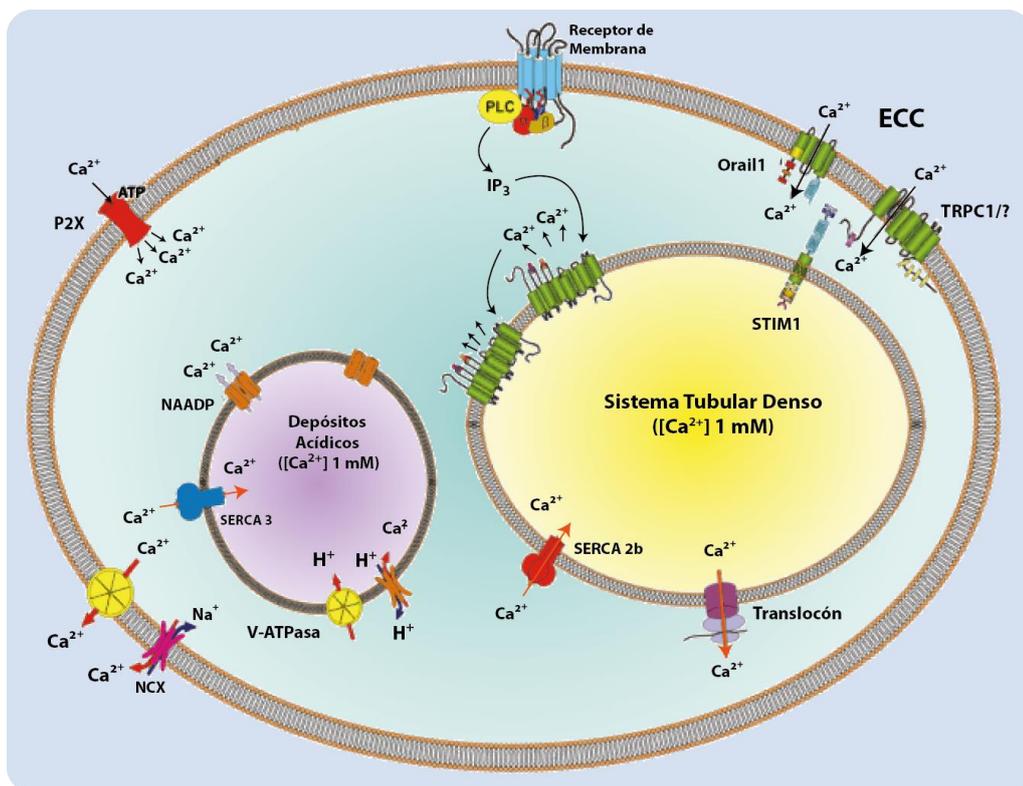


Figura 12: Homeostasis del Ca^{2+} en las plaquetas. La estimulación celular por agonistas activa la formación de segundos mensajeros que inducen a la liberación de Ca^{2+} almacenado en el sistema tubular denso (STD) o almacenes ácidos. Abreviaturas: Adenosina 5'-trifosfato (ATP); D-1,2-diacilglicerol (DAG); entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC); entrada no capacitativa de Ca^{2+} (ENCC); intercambiador H^+/Ca^{2+} (HCX); inositol 1,4,5-trifosfato IP_3 ; receptor de IP_3 (IP_3R); intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX); canales de dos dominios de poro (TPC) (adaptado de Rosado y cols., 2004, Jardín Polo, 2011).

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

- 3.1 TIPOS DE ROS
- 3.2 GENERACIÓN *in vivo* DE ROS
- 3.3 DEFENSAS CELULARES CONTRA LA ROS
- 3.4 EFECTO DE LA ROS SOBRE LOS COMPONENTES CELULARES
- 3.5 ROS Y PLAQUETAS
 - 3.5.1 ROS DERIVADO DE LAS PLAQUETAS

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés: *reactive oxygen species*), agrupa a una serie de radicales libres y no radicales, cuya estructura alberga un átomo de oxígeno y son químicamente muy reactivas, debido a su corta vida media, baja selectividad y elevada reactividad (Rosado y cols., 2004). En la mayor parte del siglo XX, las especies reactivas del oxígeno (ROS) eran consideradas como un “*agente de oxidación*”, que causa daños en los tejidos. Al entrar en el siglo XXI, estamos empezando a reconocer que las ROS se producen de una manera bien regulada para ayudar a mantener la homeostasis a nivel celular, es decir, son esenciales para las funciones biológicas, ya que regulan muchas vías de transducción por reacción y modificación directa con las proteínas, factores de transcripción y genes, para modular sus funciones en pro de la supervivencia y proliferación celular (Beckman y cols., 1998).

Sin embargo, cuando el aumento de ROS alcanza un cierto nivel (umbral tóxico), puede desbordar la capacidad antioxidante de la célula y ser altamente reactivo con el DNA, proteínas y lípidos, causando la modificación oxidativa de estas biomoléculas y alterar sus funciones. Un leve aumento en el nivel de ROS puede dar lugar a una alteración celular transitoria, pero un aumento severo puede causar daño o *estrés oxidativo* irreversible, provocando la muerte celular. Ahora se reconoce que prácticamente todos los estados de la enfermedad implica un cierto grado de *estrés oxidativo* (es decir, desequilibrio en la producción/eliminación de radicales libres) (Hensley y cols., 2002; Dachary, 2008).

3.1 TIPOS DE ROS

La mayoría de las investigaciones sobre las especies reactivas de oxígeno, las han clasificado en dos tipos: los radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita molecular externa, y los no radicales libres, que no contienen electrones desapareados, pero son químicamente reactivos y se pueden convertir en radicales (Trachootham y cols., 2009).

Dentro de las ROS, las especies de **radicales** de mayor interés desde el punto de vista biológico son el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}^-$), el óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), el radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) y el radical alcoxilo ($\text{RO}\bullet$). Y dentro de las



especies **no radicales**, los más importantes son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el oxígeno singlete ($1O_2$). En la tabla 3 describimos brevemente alguna de las características más importantes de aquellas moléculas representativas de ROS.

Tabla 3: Tipos de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Especies Reactivas de Oxígeno	Reacción química	Descripción
Anión superóxido	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + \bullet O_2^-$	Es una molécula relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otras ROS, que a su vez son muy reactivas y peligrosas. Su eliminación esta mediada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Sufre dismutación para formar H_2O_2 espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de $\bullet OH$ catalizado por metales (Redondo, 2004; Le Bras y cols., 2005).
Radical hidroxilo	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + \bullet OH^- + Fe^{3+}$ $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH + \bullet OH^- + O_2$	Es extremadamente reactivo e inestable, ataca la mayoría de los componentes celulares. Es el iniciador más potente de reacciones en cadena de los radicales libres. Se producen a través de las reacciones de Fento y Haber-Weiss (Redondo, 2004; Dachary, 2008).
Óxido Nítrico	$L\text{-arginina} + O_2 \rightarrow \bullet NO + L\text{-citrulina}$	Es un gas lipofílico e hidrosoluble, de vida relativamente larga (3-5 s). Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, reacción catalizada por el óxido nítrico sintasa (NOS). Dicha enzima presenta tres isoformas: la neuronal nNOS (tipol), la endotelial eNOS (tipolll) ambas se expresan de manera constitutiva y cuya actividad está regulada por la concentración intracelular de Ca^{2+} . La última es la inducible iNOS (tipo II) está involucrada en la respuesta inmune. Sus funciones a nivel del organismo son, por ejemplo, regular el flujo sanguíneo local, inhibir la agregación plaquetaria, aunque también presenta acciones negativas, como inhibir las enzimas mitocondriales.
Radical Peroxilo	$R\bullet + 2O_2 \rightarrow \bullet ROO$	Son los más abundantes en los sistemas biológicos. No es tan reactivo. Se forma a partir de la adición de oxígeno a cualquier radical hidrocarbónico. Tiene una vida media larga (Darley-Usmar y cols., 1995).
Peróxido de Hidrógeno	$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	No es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados, pero tiene gran capacidad para la formación de otros RL como el hidroxilo (OH^-) o anión superóxido ($\bullet O_2$). Tiene una larga vida biológica, con la capacidad de atravesar membranas biológicas (Redondo, 2004; Le Bras y cols., 2005).
Peroxinitrito	$NO + O_2^- \rightarrow \bullet ONOO^-$	Es una especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, como los residuos de tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, del ADN, lípidos o enzimas metabólicas. También es capaz de oxidar y producir depleción de antioxidantes endógenos como el ascorbato, glutatión y la SOD (Bradi y cols., 2002).
Radicales lipídicos	1) $A\bullet + LH \rightarrow AH + L\bullet$ 2) $L\bullet + \bullet OO \rightarrow \bullet LOO$ $LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet$ 3) $L\bullet + LOO\bullet \rightarrow LOOL$	Son radicales formados por la interacción de los radicales superóxido e hidroxilo con los ácidos grasos polinsaturados. Se generan durante el proceso de peroxidación lipídica de las membranas biológicas. La lipoperoxidación proporciona el ejemplo clásico de la cadena de reacción de auto-propagación en tres fases: iniciación (1), propagación (2) y terminación (3). Donde L es el lípido (habitualmente un ácido graso insaturado), $LOO\bullet$ es el radical peroxilipídico y LOOH es el hidroxiperóxido lipídico. La modificación oxidativa de lípidos y proteínas puede causar un rápido deterioro y muerte celular (Usmar cols., 1995).

3.2 GENERACIÓN *in vivo* DE ROS

A medida que se han realizado investigaciones más minuciosas sobre el papel o efecto de la ROS sobre la célula, se ha visto que no depende de un aspecto meramente cualitativo, sino que es un problema más bien cuantitativo. Los procesos fisiológicos normales del organismo generan *per se* cierta tasa de sustancias oxidantes (Thannickal y Fanburg, 2000; Redondo, 2004). Las principales fuentes endógenas de radicales libres en el organismo son:

- **Generación de ROS durante la respiración mitocondrial:** En la formación de ATP a través del metabolismo oxidativo y transporte electrónico mitocondrial el O_2 se reduce normalmente hasta agua. Así el O_2 se reduce en 4 etapas en cada una de las cuales se transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial no es perfecto y la reducción del oxígeno genera anión superóxido ($\bullet O_2^-$). La dismutación espontánea y enzimática del $\bullet O_2^-$ da lugar a la formación de H_2O_2 , y tanto el $\bullet O_2^-$ como el H_2O_2 , pueden generar radicales $\bullet OH$. De este modo, se estima que en condiciones fisiológicas normales entre el 1 y el 3 % de oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres (Perón y cols., 2001; Lee y cols., 2004; García Alonso, 2005).
- **Reacción en cadena de peroxidación lipídica:** Los radicales libres son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico ($L\bullet$), cual puede reaccionar con el O_2 dando lugar a un radical peroxilo ($ROO\bullet$), estos radicales contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica sustrayendo átomos de H^+ de otros ácidos grasos insaturados cercanos, generando así nuevos radicales lipídicos ($L\bullet$) e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH\bullet$). Estos se descomponen en radicales alcoxilo ($RO\bullet$) y peroxilo ($ROO\bullet$) contribuyendo a la propagación del daño oxidativo (Verseci y cols., 1997; Lee y cols., 2004; García Alonso, 2005).
- **Peroxisomas:** Poseen una gran variedad de enzimas que remueven electrones de metabolitos, los cuales son utilizados para generar H_2O_2 a partir de oxígeno molecular (O_2), además poseen la enzima catalasa, la cual descompone el H_2O_2 . La co-existencia de estos dos sistemas permite que exista un balance entre la producción y generación de ROS con el fin de evitar un estado de *estrés oxidativo* (Singh, 2002; Jiménez y Silva, 2003). Se ha postulado que el peroxisoma consume aproximadamente del 10 al 30 % de todo el oxígeno celular consumido en el hígado, por lo que se le atribuye una participación importante en el metabolismo de la ROS (Singh, 1997; Jiménez y Silva, 2003).
- **Leucocitos:** Los leucocitos polimorfonucleares, constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleuquinas y otros). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa, generadora de O_2 que en presencia de



hierro se transforma en el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}^-$). Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios (Sohal y cols., 1995; Perón y cols., 2001).

- **Xantina deshidrogenasa:** Esta enzima predomina en los endotelios e hígado, existen dos tipos: *tipo D*, que es estimulada por el NAD^+ con formación de NADP, mientras que la del *tipo O*, es dependiente del O_2 . Esta enzima es encargada del catabolismo de las purinas en muchos tejidos, y provoca la oxidación de la hipoxantina a xantina y ácido úrico, con la generación del radical superóxido (Wau y cols., 1976; Ramírez y cols., 2000).

3.3 DEFENSAS CELULARES CONTRA LAS ROS

Como ya mencionamos, cuando la producción de especies reactivas supera la tasa de su eliminación, se dice que existe un *estrés oxidativo* y para contrarrestar los efectos nocivos de la ROS el organismo posee diferentes mecanismos de defensa antioxidante **endógenos**: que constituyen los sistemas enzimáticos, encontrándose fundamentalmente en los peroxisomas y en menor proporción en el citosol y retículo endoplasmático. Y antioxidantes **exógenos**: que son sistemas no enzimáticos, es decir adquiridos en la dieta. Los más representativos están resumidos en la tabla 4.

Tabla 4: Principales sistemas de defensa antioxidante del organismo *

Sistema	Función
Antioxidantes endógenos	
Superóxido dismutasa (SOD)	Es la primera barrera de defensa contra la producción de radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$) convirtiéndolo en H_2O y O_2 (Zelko y cols., 2002).
Glutación peroxidasa (GPx)	Es dependiente del selenio y cataliza la reducción del H_2O_2 a agua y de los peróxidos lipídicos a alcoholes no tóxicos (Matés y cols., 1999).
Glutación reductasa (GRed)	Cataliza la reducción de glutación oxidado a reducido (GSH), el cual será utilizado por la GPx para la reducción del peróxido (H_2O_2) y de lipoperóxidos (LOOH) (León y cols., 2004).
Glutación transferasa (GST)	Catalizan la conjugación del glutación a varios compuestos electrofílicos, eliminación de peróxidos lipídicos.
Peroxidasa	Cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del H_2O_2 y peróxidos lipídicos, descomponiéndolos en agua (García y cols., 1994).
Catalasa	Cataliza la descomposición del H_2O_2 a agua y oxígeno (García y cols., 1994).
Antioxidantes exógenos	
Vitamina E	Engloba múltiples tocoferoles, de los cuales el más importante es el α -tocoferol, por ser el antioxidante más potente y un importante inhibidor de la formación de nitrosaminas por su capacidad de captar óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). Otra función importante es la protección contra la peroxidación lipídica (Aruoma, 1996).
Carotenoides	Este término se aplica al β -caroteno (precursor de la Vitamina A) y a compuestos similares. Desactiva el oxígeno singlete y radicales libres, además es capaz de bloquear la cadena de reacciones de peroxidación (Edge y cols., 1994).
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Es una coenzima de oxidación-reducción que funciona también como defensa ante los radicales libres. El ascorbato reducido puede regenerar la forma reducida de la Vitamina E, donando electrones en un ciclo redox (Chen y Tappel, 1995).
Compuestos fenólicos	Es captador de radicales libres y presenta una actividad quelante de metales (Yamaguchi y cols., 1999).
Ácido fólico o Vit. B9	Hidrosoluble necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina, su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico, actúa como transportador de átomos de carbono, importante para la síntesis de purinas y por ende para el ciclo celular (Escorza y cols., 2009).

*(Tabla adaptada de García Alonso, 2005)



3.4 EFECTO SOBRE LOS COMPONENTES CELULARES

- **Daño oxidativo a los lípidos:** Los radicales libres de alta reactividad, como el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), pueden sustraer un átomo de H^+ de los ácidos grasos; esta reacción ocurre en mayor medida en las membranas celulares y en las lipoproteínas; por consiguiente, al disminuir la fluidez de las membranas biológicas, inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana y aumentar la permeabilidad al Ca^{2+} , se favorece la formación de numerosos derivados tóxicos como los hidroperóxidos, los 4-hidroxi-alquenoales (Dennis y Shibamoto, 1989; Sevanian y Ursi, 2000).
- **Daño oxidativo a las proteínas:** El blanco principal de oxidación es a los grupos amino y carbonilo. Los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo del $\bullet\text{OH}$ son el triptófano, la tirosina, la fenilalanina, la metionina y la cisteína (Stadtman y Levine, 2000). Muchas ROS son capaces de oxidar grupos sulfhidrilos de las proteínas, o reaccionar con iones metálicos para generar una potente especie, como el catión nitronio, capaz de nitrar muchos aminoácidos. Como resultado del ataque de las ROS, se producen entrecruzamientos de cadenas polipeptídicas y fragmentación de las proteínas, perdiendo así su función biológica. Las consecuencias bioquímicas de las modificaciones oxidativas a las proteínas, incluyen la pérdida de la función de receptores, enzimas y proteínas de transporte, así como la generación de nuevos antígenos que provocan respuestas inmunitarias (Simonian y Coyle, 1996).
- **Daño oxidativo al ADN:** El $\bullet\text{OH}$ es la principal especie oxidativa que actúa sobre el ADN. Los daños fundamentales están en la ruptura de las hebras del ADN, hidroxilación de bases y fragmentación del azúcar 2-desoxi-D-ribosa. Además, la movilización de Ca^{2+} inducida por las ROS puede activar endonucleasas dependientes de este catión y provocar la fragmentación del ADN (Southorn y cols., 1988; Henle y Linn, 1997; Box y cols., 2001).

3.5 ROS y PLAQUETAS

En los últimos años, varias publicaciones han sugerido que la ROS representa un nuevo modulador de la actividad plaquetaria. Dentro del vaso sanguíneo (células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas), hay una constante y baja cantidad de flujo de ROS. Se ha establecido que un incremento en la liberación de ROS de la pared vascular puede, indirectamente, afectar la actividad plaquetaria por secuestro del óxido nítrico (NO), disminuyendo así la propiedad anti-plaquetaria del endotelio. Además, las plaquetas también pueden generar ROS, como parte del control de su propia actividad biológica o incluso estar expuestas a grandes cantidades de ROS en condiciones de reacción inflamatoria (Krotz y cols., 2004).

Ungvari y cols., demostraron que niveles altos en la producción del radical superóxido, influían negativamente sobre la regulación de la agregación plaquetaria, produciendo una excesiva activación de la misma, interviniendo la disponibilidad del NO, ya que reacciona con él y forma el peroxinitrito (ONOO^-), lo cual impide que ese NO secuestrado actué normalmente inhibiendo la agregación plaquetaria. Además ese radical superóxido genera un aumento en la síntesis de los tromboxanos (Ungavari y cols., 2003).

Varios estudios independientes han mostrado que el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) reduce el umbral de activación de las plaquetas frente a la estimulación con trombina, colágeno, ADP, o AA y puede incluso inducir la agregación espontánea (Handin y cols., 1977; De la cruz y cols., 1992; Krotz y cols., 2004). En todos los casos el $\bullet\text{O}_2^-$, pero no el $\bullet\text{OH}^-$ o H_2O_2 va a mediar un aumento de la actividad plaquetaria (Salvemini y cols., 1989). Pratico y cols., demostraron que el $\bullet\text{OH}^-$, se genera durante la agregación plaquetaria en sangre entera, inducida por colágeno y que el manitol secuestrador del $\bullet\text{OH}^-$ evita en parte esta agregación, lo que sugiere que este tipo de ROS puede estar involucrado en el aumento de la activación plaquetaria dependiente de colágeno (Pratico y cols., 1999).

Redondo y cols., en el 2004 observaron que el H_2O_2 es capaz de provocar liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares sensibles y no-sensibles a agonistas, mediante una oxidación de los puentes de disulfuro, que provoca un cambio conformacional en el canal de Ca^{2+} sensible a IP_3 . Adicionalmente, el H_2O_2 es capaz de inhibir la actividad de las bombas SERCA Y PMCA.

3.5.1 ROS DERIVADO DE LAS PLAQUETAS

Las ROS son también generadas por la propia actividad plaquetaria. El aumento de $\bullet\text{O}_2^-$ y otras ROS fue observado por primera vez en las plaquetas, por Marcus en 1977 (Marcus y cols., 1977). Donde la liberación de ROS, incluyendo el $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}^-$ y H_2O_2 , estaban presentes tanto antes como después de la estimulación con agonistas, como el colágeno o trombina (Caccese y cols., 2000; Wachowicz y cols., 2002); por lo tanto esta formación endógena de ROS sugiere su rol autocrino y paracrino en la activación plaquetaria.

Varios sistemas enzimáticos contribuyen a la producción de ROS que van a influir en la actividad plaquetaria. Al igual que en el endotelio, en las plaquetas encontramos la NAD(P)H-oxidasa, la cicloxigenasa isoforma 1 y 2 (COX), citocromo P450, epoxigenasa isoforma 2C9(CYP2C9), xantina oxidasa (XO), sintasa endotelial del NO (eNOS) y contribuyen a la producción de $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}^-$ y H_2O_2 . A La NAD(P)H-oxidasa plaquetaria, se le ha prestado mayor atención ya que puede ser activada por estimulación de agonistas que también inducen la activación plaquetaria. Por ejemplo, al producir la liberación de $\bullet\text{O}_2^-$, aumenta el reclutamiento plaquetario para la formación del trombo, muy probablemente por la desactivación de una ectoendonucleotidasa plaquetaria y a que aumenta la bio-disponibilidad del ADP (Fig. 13) (Krotz y cols., 2002; Iuliano y cols., 1997; Pignatelli y cols., 2003; McVeigh y cols., 2002).



También sabemos que el H_2O_2 posee un papel dual sobre la activación y mantenimiento de la ECC, dependiendo de la dosis, ya que a bajas dosis produce un incremento de dicho mecanismo, mientras que a altas dosis se produce una fuerte inhibición. Este papel dual viene dado por la capacidad del H_2O_2 de inducir polimerización del citoesqueleto de actina y activación de la proteína p60^{src} (Redondo y cols., 2004).

Hay que señalar que las plaquetas expresan antioxidantes enzimáticos, lo que también sugiere el rol de la ROS en la señalización plaquetaria, ya que estas enzimas no solo previenen los efectos citotóxicos de la ROS, sino también sirven para regular las oxidaciones producidas en las vías de señalización plaquetaria. Una de estas enzimas es la glutatión peroxidasa (GPx), cuya deficiencia congénita aumenta el riesgo de trombosis (Freedman y cols., 1996); además, mejora la bio-disponibilidad del NO al catalizar su liberación desde los S-nitrosotioles (ya que el NO se almacena en los tejidos bajo la forma de S-nitrosotioles) y la reducción de peróxidos lipídicos (Freedman y cols., 1995). Varios estudios han demostrado que la formación de S-nitrosotiol, en el plasma y en los eritrocitos circulantes, que actúan como transportadores de NO, está envuelto en la regulación del tono vascular y el flujo sanguíneo; sugiriendo que los S-nitrosotioles pueden servir como reservorio de NO. La utilización de la butionin sulfoxamina (BSO) como inhibidor intracelular de la glutatión evita la liberación del NO y por ende es capaz de deplecionar los almacenes de NO (Rodríguez y cols., 2003).

Mediante el uso del glutatión (GSH) como co-sustrato, la GPx no solo reduce el H_2O_2 a agua, sino que también reduce los peróxidos lipídicos a sus respectivos alcoholes (Loscalzo y cols., 2001). Consecuentemente, la adición de GSH, reduce la agregación plaquetaria *in vitro* (Pacchiarini y cols., 1996); sin embargo la forma oxidada del GSH, el disulfuro de glutatión (GSSG) al unirse con la integrina $\alpha IIb\beta_3$ presente en las plaquetas, llega hacer un mecanismo facilitador de la activación plaquetaria inducida por agonistas. Esto sugiere que el GSH puede contribuir en la regulación de la actividad plaquetaria (Essex y cols., 2004).

Debido a la complejidad de la química de la ROS y a la gran cantidad de fuentes de regulación enzimática que están potencialmente implicadas, el papel de la ROS para la activación plaquetaria y de los diferentes sistemas enzimáticos productores de ROS aún no están claros. Posiblemente la mera presencia de ROS en las inmediaciones de las plaquetas, define las condiciones del campo de batalla fisiológico en el cual las plaquetas encuentran su destino fisiopatológico (Krotz y cols., 2004).

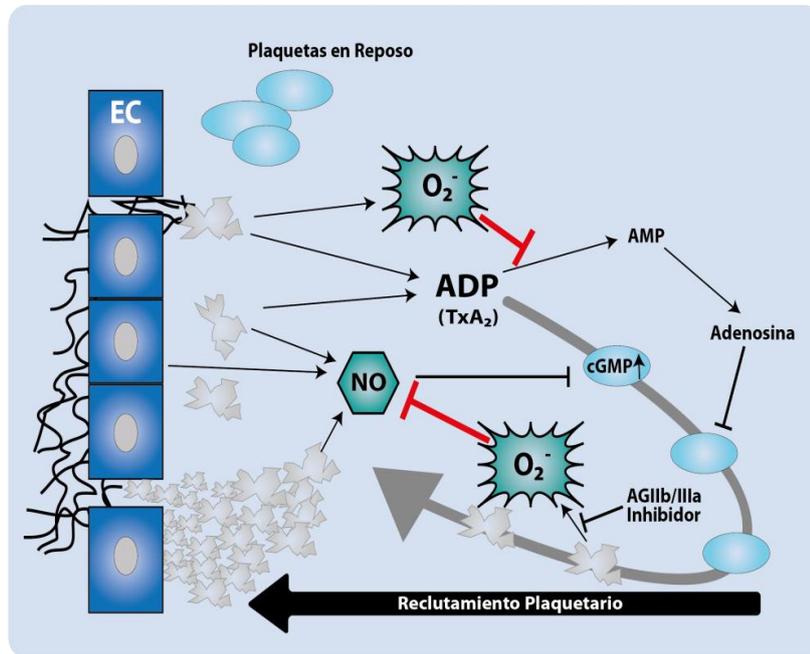


Figura 13: Reclutamiento plaquetario en un trombo en formación, por aumento del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$). Las plaquetas en reposo, al entrar en contacto con los componentes de la matriz subcelular (líneas curvas), se unen al endotelio y se activan. Las plaquetas activadas (forma irregular) liberan ADP (o TXA_2) que conduce al reclutamiento de otras plaquetas circulantes en estado de reposo (óvalos). En la estimulación, las plaquetas también liberan ROS, tales como el $\bullet\text{O}_2$ que incrementan la formación del trombo, ya sea por prevención de la degradación del ADP o por disminución de la bio-disponibilidad del óxido nítrico (NO). El óxido nítrico en condiciones fisiológicas, evita la activación plaquetaria por un aumento de GMPc intra-plaquetario. La liberación plaquetaria de $\bullet\text{O}_2$ puede prevenirse mediante el inhibidor de la GPIIb/IIIa (Krótz y cols., 2004).



4. CIRROSIS HEPÁTICA

- 4.1 GENERALIDADES
- 4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LA CIRROSIS BILIAR
- 4.3 CIRROSIS BILIAR
 - 4.3.1 ALTERACIONES EN EL FLUJO SANGUÍNEO
 - 4.3.2 EL DAÑO OXIDATIVO
- 4.4 FISIOPATOGENIA DE LA HEMOSTASIA EN LA CIRROSIS
 - 4.4.1 DEFECTOS EN LA COAGULACION Y FIBRINÓLISIS
 - 4.4.2 DISFUNCION PLAQUETARIA
 - 4.4.3 INSUFICIENCIA RENAL
 - 4.4.4 INFECCIONES
 - 4.4.5 CITOQUINAS Y CIRROSIS
 - 4.4.6 ÓXIDO NÍTRICO
 - 4.4.7 HOMOCISTEÍNA
 - 4.4.8 HOMOCISTEÍNA EN LA CIRROSIS
 - 4.4.8.1 PATOGENIA DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

4. CIRROSIS HEPÁTICA

4.1 GENERALIDADES

La cirrosis hepática es el estadio final de un gran número de enfermedades que afectan al hígado. Las alteraciones estructurales causadas por esta enfermedad fueron detectadas por primera vez en 1760 por Morgagni; en 1819 Laennec, describe la enfermedad de un soldado muerto de hemorragias, derrame pleural y ascitis, como “cirrosis” (del griego *kirrhos*=amarillo), debido a las granulaciones amarillas que presentaba el hígado, a las cuales les atribuyó equivocadamente una etiología tumoral. Bright en 1827 señala al alcoholismo como el responsable de una hepatopatía hidropígena. Ackerman y Kretz consideran, en 1880 que la lesión comienza a nivel del hepatocito y que la repetición de procesos de regeneración y degeneración consigue alterar la estructura con proliferación de tejido conectivo (Kervella, 1985; Marecos, 2000; Trejo-Solis y cols., 2003).

La cirrosis es una enfermedad crónica, caracterizada por una alteración difusa de la arquitectura hepática con presencia de fibrosis y nódulos de regeneración y una pérdida funcional de la masa hepática. La fibrosis resulta de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, principalmente el colágeno que es la proteína más abundante en esta estructura. El colágeno se acumula por una disminución importante en su degradación, considerándose un proceso auto-perpetuable e irreversible. Estos cambios conducen el desarrollo de hipertensión portal e insuficiencia hepática que condicionan las posibles complicaciones que se pueden presentar. Hay que tener en cuenta que la cirrosis hepática es un factor predisponente para el desarrollo de carcinoma hepatocelular, con un riesgo del 20 % tras 5 años de seguimiento (Durand & Valla, 2008; Cardenas, 2009).

Esta enfermedad constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo, considerándose como una de las diez principales causas de mortalidad, estimándose 800.000 muertes cada año a nivel mundial (WHO, 2010). En Europa es considerada un importante problema de salud pública, especialmente entre la población masculina, causando más de 170.000 muertes/año.

La cirrosis hepática se puede clasificar en *compensada* o *descompensada*. Se denomina *cirrosis descompensada* cuando se asocia a la presencia de alguna de las siguientes complicaciones mayores: hemorragia digestiva, ascitis, encefalopatía hepática o ictericia. La *cirrosis compensada* es la que no ha desarrollado ninguna de las complicaciones mayores.

Las causas más frecuentes de cirrosis hepática en la edad adulta son el consumo crónico de alcohol y los virus de la hepatitis B y C. Etiologías menos frecuentes son la hemocromatosis idiopática, la enfermedad de Wilson, la hepatitis autoinmune, fibrosis quística, la esteatohepatitis no alcohólica, las colestasis obstructivas crónicas (cirrosis biliar), la obstrucción del drenaje venoso y la hepato-toxicidad (López y col., 2001; Trejo-Solis y cols., 2003).

4.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE CIRROSIS

Los modelos experimentales en animales, usados para el estudio de la cirrosis hepática, son:

- **Administración de sustancias con efecto hepatotóxico:** Como la dimetilnitrosamina o el tetracloruro de carbono (CCl_4). La dimetilnitrosamina, además de su efecto hepatotóxico, posee una potente actividad carcinogénica, por lo que su uso es más restringido. El CCl_4 es el hepatotóxico más empleado desde que, en 1936, Cameron y Karunaratne indicaron que su administración repetida a ratas produce cirrosis hepática. Desde entonces, la cirrosis hepática inducida por CCl_4 ha sido objeto de numerosos estudios, usando ratas u otras especies animales, así como diferentes dosis y modos de administración del tóxico. El CCl_4 puede ser administrado de forma subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; introducido por medio de una sonda gástrica o administrado por nebulización en el interior de una cámara estanca.
- **Administración de alcohol:** En este modelo se utilizan dietas con elevado contenido de alcohol, sin embargo este modelo es poco usado ya que la aparición de lesiones histológicas importantes sólo es evidente tras periodos muy largos de tratamiento.
- **Ligadura parcial de la vena porta (LVP):** Es realmente un modelo de hipertensión portal, ya que este tipo de ligadura va a producir el desarrollo gradual de venas portales colaterales. Esta vía circulatoria paralela priva a la circulación hepática de flujo portal y proporciona una vía a través de las cuales múltiples toxinas eluden el metabolismo hepático, causando



encefalopatía y fallo hepático en un modelo de hipertensión portal (Wiest y cols., 1999; Reyero y cols., 2001).

- **Ligadura del conducto biliar (LCB):** Es el modelo experimental más estudiado, se basa en la obstrucción total o parcial de los conductos biliares. Para ello, se practica la ligadura del ducto biliar común (LCB) o la ligadura parcial (LCBP), es decir de uno de los dos ductos biliares (derecho o izquierdo). Dichos modelos se caracterizan por una alteración del transporte de sales biliares (provocando una colestasis) (Rodríguez-Garay, 2003), el desarrollo de fibrosis (Milani y cols., 1990) y, en estadios más tardíos, la cirrosis biliar (Serviddio y cols., 2004). Según los autores, a los 15 días se manifiestan los signos de la colestasis y a los 28 días aproximadamente un 75 % de las ratas tienen cirrosis establecida (Martínez-Prieto y cols., 2000). Produce una lesión histológica similar a la cirrosis humana y se acompaña de ascitis abundante.

Los dos últimos modelos son capaces de provocar una hipertensión portal presinusoidal sin daño hepático, pero que produce de modo predecible y homogéneo la mayoría de las alteraciones hemodinámicas que se observan en la cirrosis.

Los conocimientos actuales sobre la colestasis extrahepática inducida por ligadura del ducto biliar muestran una alteración de la expresión de proteínas canaliculares de la membrana plasmática, debido a la degeneración de la ruta de transporte vesicular, y también a la pérdida de la integridad de las uniones estrechas. La colestasis obstructiva se caracteriza por la retención de la bilis en los conductos hepáticos (con proliferación de los mismos), hipertensión portal y la lesión centrilobular (Rodríguez-Garay, 2003). A dichas modificaciones se asocian trastornos metabólicos, alteración del metabolismo de los ácidos grasos y de los cuerpos cetónicos (Lang y cols., 2001) y pérdida de la función mitocondrial (Huang y cols., 2003), que a su vez está asociada a una mayor producción de estrés oxidativo (Serviddio y cols., 2004).

4.3 CIRROSIS BILIAR

La cirrosis biliar se debe a una lesión u obstrucción prolongada del sistema biliar intrahepático o extrahepático. Se acompaña del trastorno de la excreción biliar, destrucción del parénquima hepático y fibrosis progresiva. La **cirrosis biliar primaria (CBP)** se caracteriza por inflamación crónica y obliteración fibrosa de los conductillos biliares intrahepáticos. La **cirrosis biliar secundaria (CBS)** es consecuencia de la obstrucción prolongada de los conductos biliares extra-hepáticos. Aunque las cirrosis biliares primaria y secundaria son entidades diferentes desde un punto de vista fisiopatológico con respecto a su desencadenante inicial, muchos de sus rasgos clínicos son similares. La causa de la CBP es desconocida, pero muchos datos sugieren que puede ser debida, primero a una anomalía hereditaria de inmunoregulación, caracterizada por la incapacidad de suprimir una respuesta

inflamatoria sobre los conductos biliares pequeños; la segunda causa puede ser medioambiental, un evento desencadenante que pone en movimiento el proceso inflamatorio. Teóricamente, cualquier factor que dañe los conductos biliares puede servir de estímulo disparador (Zumaeta y cols., 1998; Harrison, 2006; Cárdenas, 2009).

La mayoría de los estudios están más enfocados a la CBP, debido a que su incidencia y prevalencia han aumentado en los últimos años, probablemente porque la mayoría de los casos se diagnostican en etapas muy iniciales y asintomáticas, cuando solo se detecta una leve alteración bioquímica o la presencia de anticuerpos anti-mitocondriales (AMA) o bien en el proceso de otras enfermedades asociadas (Pares, 2008).

En la CBP, el impedimento en el flujo normal de la bilis desde el polo canicular del hepatocito al duodeno, se asocia a un aumento de las concentraciones séricas de compuestos que normalmente se excretan en la bilis, tales como los ácidos biliares, la bilirrubina y de las enzimas γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT), y fosfatasa alcalina (FA) (Pérez Fernández y cols., 2004; Arduni, 2009). Estos compuestos potencialmente tóxicos dentro del hepatocito, desencadenan procesos apoptóticos y necróticos en el hígado. Dichos acontecimientos son los responsables de desencadenar la fibrosis hepática que conduce finalmente a la cirrosis biliar (McGill y col., 1998; Arduni, 2009).

4.3.1 ALTERACIONES DEL FLUJO SANGUÍNEO

La circulación hepática es de naturaleza centrípeta y está formada por el sistema porta y la arteria hepática. El sistema porta transporta sangre poco oxigenada y rica en nutrientes, proveniente del tracto gastrointestinal, del páncreas y del bazo. Este sistema constituye el 70-75 % del flujo sanguíneo hepático, siendo el restante 25 % proporcionado por la arteria hepática (Belloch, 2009).

Uno de los aspectos fisiopatológicos claves para entender muchas de las complicaciones que aparecen en el transcurso de la cirrosis hepática es la existencia de un estado circulatorio hiperdinámico. Se caracteriza por un gasto cardíaco elevado, un descenso de las resistencias periféricas con hipotensión arterial y un aumento del flujo sanguíneo, fundamentalmente en el territorio esplácnico (Ferrer, 2001). Se inicia con la aparición de la hipertensión portal, que provoca desarrollo de una vasodilatación periférica arteriolar, ocasionando una hipervolemia relativa al disminuir el volumen sanguíneo arterial efectivo. Esta hipovolemia activa los sistemas presores de regulación de la presión arterial (renina angiotensina, catecolaminas y otros), que a su vez producen la retención hidrosalina, con la consiguiente expansión de volumen plasmático y el desarrollo del estado circulatorio hiperdinámico, haciendo que el balance entre la vasodilatación y vasoconstricción sea anormal. En adición a los cambios en la resistencia vascular, principalmente localizado en las arterias y arteriolas pequeñas, la función de las largas arterias también puede estar alterada en la cirrosis (Richter y cols., 2000; Ferrer, 2001; Herriksen y cols., 2001).



Aunque no se sabe con certeza qué mecanismos causan el inicio y mantenimiento del trastorno circulatorio, se conoce que el óxido nítrico (NO) desempeña un papel muy importante en la vasodilatación periférica existente, ya que el NO es un potente vasodilatador de origen endotelial que está aumentado tanto en los modelos experimentales de cirrosis como en los pacientes con cirrosis hepática (López y cols., 2001; Ferrer, 2001). Varios estudios, en animales con cirrosis, demostraron que la inhibición de la síntesis del NO reduce la circulación hiperdinámica y mejora la función excretora renal (López y cols., 2001; Atucha y cols., 2002).

En cuanto a los fenómenos hemodinámicos que acompañan a la cirrosis, se considera que los factores de riesgo clásicos (hemorragia a nivel capilar, lesión de la pared vascular, aumento de permeabilidad capilar, el aumento generalizado de la presión sistémica) permiten explicar del 50 al 60 % de los eventos cardiovasculares producidos en esta enfermedad (Robbins y cols., 2004). En la última década se han ampliado las investigaciones sobre los denominados nuevos factores de riesgo, identificando una variedad de ellos que están vinculados con el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares como son la hiperfibrinogenemia, incremento de los niveles plasmáticos del factor VII, el inhibidor del plasminógeno (PAI), la proteína C reactiva y la hiperhomocisteinemia (HHcy).

4.3.2 DAÑO OXIDATIVO

El estrés oxidativo observado en el modelo de cirrosis experimental afecta a la mitocondria. Una de las causas principales de las alteraciones del estado redox parece ser el aumento de la concentración de sales biliares hidrófobas. Así, experimentos *in vitro* han demostrado un incremento en la producción de peróxidos (por las mitocondrias) en hepatocitos sometidos a distintas concentraciones de ácidos biliares. Además, los autores mostraron que las sales biliares hidrófobas son las principales responsables de incrementar la producción de peróxidos (Sokol y cols., 1995).

En las células y tejidos sanos, más del 90 % de glutatión total está en su forma reducida (GSH) y menos del 10 % que existe en la forma de disulfuro (GSSG) u oxidada. Un aumento de la proporción entre el GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo. Una característica de la cirrosis es el incremento del GSSG, así como del cociente GSSG/GSH, y de los niveles de malondialdehído (MDA) en hígado y en plasma, además de la oxidación del ADN nuclear (Kitada y cols., 2001). En periodos largos, la disminución de GSH hepático se produce por dos mecanismos independientes: por un lado, la disminución de la expresión del gen que codifica para la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS: responsable de la homeostasis del GSH), a los 21 días de colestasis y por otro lado, la oxidación del GSH a GSSG. La administración diaria de ácido ursodeoxicólico (UDCA) en ratas puede restablecer los niveles fisiológicos del ARN mensajero de la γ -GCS y mejorar el estado redox del glutatión (Serviddio y cols., 2004; Ebrahimkhani y cols., 2005; Carnicer y cols., 2006).

Durante el desarrollo de la colestasis hepática se manifiesta una hipertensión portal, que eventualmente conlleva el desarrollo de ascitis, el cual parece estar asociado a una alteración de la función endotelial, con incremento de las sustancias vasoconstrictoras. Por ello, una defectuosa regulación de la producción del óxido nítrico, producido por las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la forma inducible (iNOS), podría estar implicada en la hipertensión portal en la cirrosis. Estudios en ratas LCB describen una regulación variable en la expresión de eNOS a lo largo del desarrollo de la fibrosis. Es relevante mencionar que, independientemente de los niveles de expresión de la enzima eNOS o iNOS, y su localización y redistribución en las células hepáticas, los niveles de NO sistémico aumentan hasta la cuarta semana. En base a estos resultados, se podría pensar que la producción de óxido nítrico y sus metabolitos (NO^2 , NO^3 y peroxinitrito) puede tener un papel importante en la regulación de la función endotelial, pero también en la modificación post-traduccional de proteínas y en la liberación de segundos mensajeros, como el GMPc (Wei y cols., 2005a; Wei y cols., 2005b). De hecho, Alcaráz y colaboradores, han mostrado que ratas con cirrosis biliar presentan niveles aumentados de peroxinitrito, en el riñón, que puede alterar la respuesta de la vasculatura renal y retención de sodio (Alcaráz y cols., 2008).

4.4 FISIOPATOGENIA DE LA HEMOSTASIA EN LA CIRROSIS

El hígado juega un rol central en el mantenimiento de la hemostasia ya que es el sitio de síntesis de la gran mayoría de proteínas requeridas para la regulación de la coagulación y fibrinólisis (Tabla 5). Por lo tanto, es lógico pensar que los pacientes con cirrosis presenten alteraciones graves en la coagulación, desencadenando disfibrinogenemia, hiperfibrinólisis y trombocitopenia, siendo esta última, la alteración más frecuente, debido en parte a la hipertensión portal, ya que el 90 % del pool plaquetario es secuestrado en el bazo (hiperesplenismo) (Kaul y col., 2000), y otra alteración en menor medida, es la presencia de anticuerpos antiplaquetarios o alteraciones en el metabolismo de la trombopoyetina.

Las pruebas de laboratorio que son más útiles y están fácilmente disponibles para evaluar la hemostasia en las enfermedades hepáticas, son el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el fibrinógeno, el recuento plaquetario y el dímero D (CadwellSH y cols., 2006). En los últimos años se está generalizando el uso del tromboelastograma, para valorar *in situ*, la predicción de sangrado y de una forma dinámica la coagulación, generalmente durante una cirugía mayor. (López y col., 2008), ya que el TP y el TTPa no valoran los factores inhibitorios, como la proteína C o S.



Tabla 5: Factores de coagulación y lugar de síntesis

Factor	Síntesis	Función
Procoagulantes		
Fibrinógeno	Hígado	Precursor de fibrina
Factor II	Hígado	Precursor de trombina
Factor V	Hígado, endotelio	Cofactor en complejo protrombinasa
Factor VII	plaquetas	Unido a TF activa a los factores IX y X
Factor VIII	Hígado	Cofactor
Factor IX	Hígado	Activa al factor X
Factor X	Hígado	Convierte protrombina a trombina
Factor XI	Hígado	Activa factor IX
Factor XII	Hígado	Activa factor XI
Factor XIII	Hígado	Une polímeros de fibrina
Precalicroina	Hígado	Activa factor XII
HMWK	Hígado	Activación del cofactor de factores XII y XI
Factor III (FT)	Hígado Endotelio, monocitos	Cofactor
Anticoagulantes		
Antitrombina III	Hígado	Inactiva la trombina, factores IXa, Xa, XIa, XIIa
Cofactor II de heparina	Hígado	Inactiva la trombina
Proteína C	Hígado, endotelio	Inactiva factores Va y VIIIa
Proteína S	Hígado, endotelio	Aumenta actividad de proteína C
Heparan sulfato	Endotelio	Ligando de antitrombina III
Trombomodulina	Endotelio	Receptor de trombina permitiendo la unión a la proteína C
TFPI (1-2)	Endotelio, hígado	Inhibe factor VIIa y Xa
Fibrinolíticos		
Plasminógeno	Hígado	Precursor de plasmina
t-PA	Endotelio	Activa plasminógeno
Urocinasa	Riñón	Activa plasminógeno
Anti-Fibrinolíticos		
Inhibidor de t-PA-1	Endotelio, hígado	Inhibe t-PA
Inhibidor de t-PA-2	plaquetas	Inhibe t-PA
α -antiplasmina	Leucocitos	Inactiva a la plasmina
TAFI	Hígado	Inhibe la activación del plasminógeno

Factor tisular (TF), Inhibidor de la vía del factor tisular, (TFPI), Activador tisular del plasminógeno (t-PA), inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (Téllez-Avila y cols., 2007).

Debido a que en la cirrosis existe una progresiva disfunción endotelial, el aumento en la producción de NO y prostaciclina (PGI₂) por parte de las células endoteliales va a inhibir la activación plaquetaria en estos pacientes. Y por el contrario, la elevada concentración que alcanza el vWF, en pacientes cirróticos, va a estimular la adhesión plaquetaria.

Si bien los niveles de factor VIII se encuentran aumentados, un número importante de factores V, VII, IX, X y XI presentan niveles reducidos; entre ellos se encuentran los

factores dependientes de la vitamina K (II, VII, IX, X) que, además, tienen alteraciones funcionales debido a una carboxilación anormal (Song y cols., 2001; Caldwell y cols., 2006). Los niveles de fibrinógeno son normales cuando la enfermedad hepática está estable, pero disminuyen en los estadios avanzados de la cirrosis o en la insuficiencia hepática aguda. En estos pacientes se estima que el fibrinógeno es funcionalmente anormal debido al excesivo contenido de ácido siálico presente en su molécula, trastorno conocido como disfibrinogenemia.

La disfunción endotelial empeora aún más las alteraciones en la coagulación de estos pacientes. Sin embargo, existen otros cambios que compensan y balancean las alteraciones antes mencionadas, como la disminución de la síntesis hepática de proteínas anticoagulantes (proteínas C, S, Z, antitrombina, la heparina cofactor II, α -2-macroglobulina). En ocasiones se verifica reducción de los niveles del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI: del inglés *tissue factor pathway inhibitor*), que habitualmente es sintetizado por las células endoteliales (Caldwell y cols., 2006).

Numerosos cambios afectan la degradación de la fibrina, con la excepción de las situaciones de insuficiencia hepática aguda, donde niveles elevados del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) pueden bloquear la fibrinólisis, en general se considera que el estado de los pacientes con enfermedad crónica estable es hiperfibrinolítico. Los niveles de activador tisular del plasminógeno (t-PA) se encuentran aumentados, dado que su degradación hepática se encuentra disminuida y su liberación por parte del endotelio activado, esta aumentada.

Otro factor que contribuye a la alteración de los mecanismos de hemostasia normal es la insuficiencia renal, puesto que va a contribuir a la aparición de ascitis, y si bien aún hay datos contradictorios, es probable que el papel etiológico de la ascitis sea importante para el mantenimiento del estado hiperfibrinolítico en estadios muy avanzados de cirrosis (Agawal y cols., 2000; López y cols., 2001; Caldwell y cols., 2006; Téllez-Ávila y cols., 2007).

Podemos resumir que en la enfermedad hepática se producen alteraciones que incluyen disminución de los factores de coagulación, trombopenia, disfunción plaquetaria, disfunción endotelial, hiperfibrinólisis, disfibrinogenemia, coagulación intravascular, fallo renal e infecciones (Fig. 14).

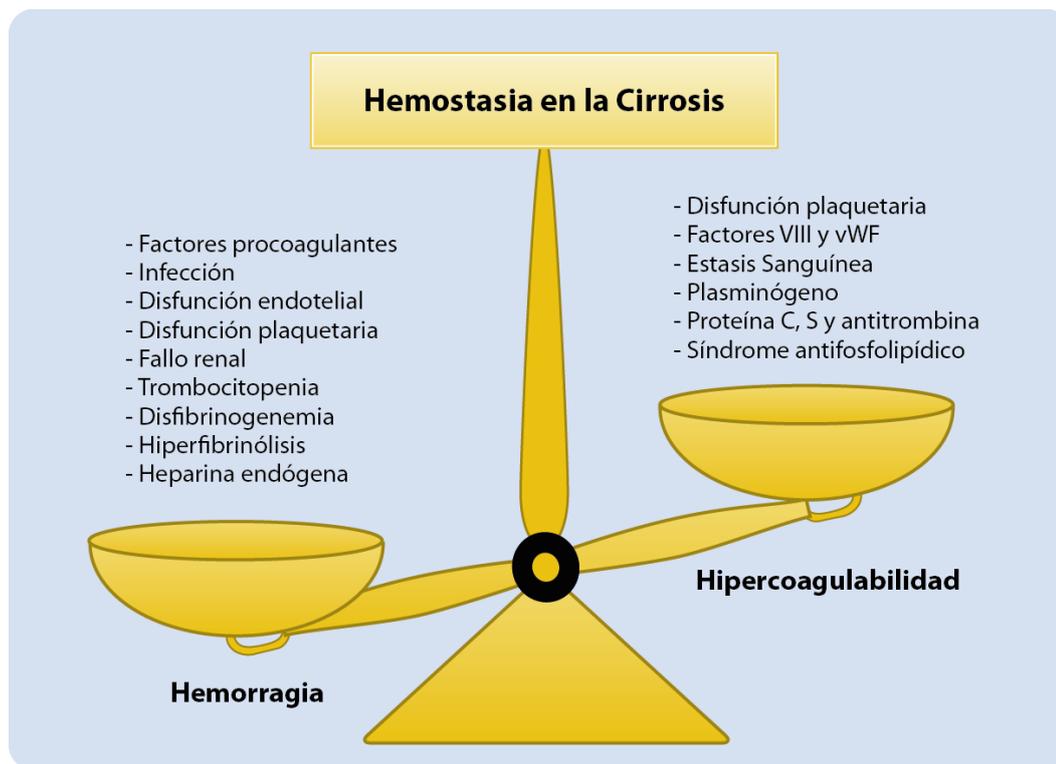


Figura. 14: Equilibrio hemostático en la enfermedad hepática (López y cols., 2008).

4.4.1 DEFECTOS DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINÓLISIS

4.4.1.1 Déficit de factores de la coagulación

Si existe disfunción hepática, se produce una alteración de la síntesis proteica que conlleva a un déficit de las proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasia, los factores de coagulación. Se trata habitualmente de los factores V, VII, IX, XI y protrombina. En el caso de insuficiencia hepática fulminante, el porcentaje del factor V, tiene valor pronóstico. Sin embargo los niveles del factor VIII suelen estar aumentados (Caldwell y cols., 2006). Otra causa de déficit de ciertos factores (II, VII, IX y X) es la falta de vitamina K de causa hepática (déficit de carboxilación por hepatopatía o mala absorción por colestasis) o extrahepática (malnutrición o alteración de la flora intestinal) (López y col., 2008).

4.4.1.2 Coagulación intravascular diseminada y fibrinólisis acelerada

En los pacientes con cirrosis descompensada, las alteraciones pueden sugerir la presencia de coagulación intravascular diseminada (CID), está caracterizada por la activación de la cascada de la coagulación y las vías de anti-coagulación, resultando en una amplia deposición intravascular de fibrina terminando en una trombosis arterial o venosa y fallo orgánico (Radosavjevic, 2007). El incremento en el consumo de factores de coagulación y plaquetarios puede también llevar a una severa hemorragia, considerándola dentro del

diagnóstico una enfermedad trombo-hemorrágica, es decir, se pueden observar tanto eventos trombóticos como hemorrágicos, en el mismo paciente.

Las características de la CID se debe a una inadecuada modulación de la actividad de la trombina y el resultado de una excesiva activación del factor VIII y del V al disminuir sus anticoagulantes naturales (antitrombina, proteína C activada, inhibidor de la vía del factor tisular (FTPI)) contribuyen a la generación de un estado de pro-coagulabilidad (Treviño, 2008). Mientras que por otro lado aumenta la fibrinólisis al neutralizar el inhibidor del activador del plasminógeno tisular de tipo 1 (PAI-1). La proteína S, cofactor de la proteína C, potencia la acción de esta para la inactivación del factor VIII y del V (Treviño, 2008).

4.4.1.3 Hipercoagulación

En los pacientes con cirrosis coexisten trastornos en la coagulación que promueven el sangrado con alteraciones procoagulantes que inducen la aparición de trombosis. Entre estas últimas se pueden mencionar la disminución en la actividad de algunos mecanismos de anticoagulación, estasis vascular como consecuencia del enlentecimiento del flujo circulatorio y los trastornos en la fibrinólisis y en la actividad plaquetaria (Sabroe y col., 2005).

En estos pacientes, la hipercoagulación se puede manifestar de 2 maneras: en forma de trombosis venosa profunda o embolia pulmonar, con una incidencia del 0,5 al 1 % (Northup y cols., 2006; Treviño, 2008). Y en forma más solapada, con microtrombosis ocultas que, con el tiempo, conducen a la hipertensión porto-pulmonar o la atrofia hepática descompensada (cuadro conocido como extinción parenquimatosas) (López y col., 2001; Trejo-Solis y cols., 2003; Caldwell y cols., 2006). Otros estados conocidos de hipercoagulabilidad que pueden producirse en la enfermedad hepática son: déficit del factor V, mutaciones de la protrombina G20210A, mutación de la metilentetrahidrofolato reductasa C677T o síndrome antifosfolípido (Amitrano y cols., 2000).

Curiosamente, el análisis de la bibliografía permite constatar la existencia de al menos dos tipos de coagulopatía, dependiendo del origen de la cirrosis hepática. Así, se ha observado que los pacientes con cirrosis hepática de origen colestásico tienen un menor número de complicaciones de sangrado al compararlos con pacientes en un estado clínico similar pero con una cirrosis de etiología viral o alcohólica (Gores y cols., 1989; Palareti y cols., 1991; Pihusch y cols., 2002). Aunque el origen de esta alteración no está claro, se ha sugerido la existencia de un estado hipercoagulable en pacientes con cirrosis biliar primaria, debido a una función plaquetaria más eficaz en estos pacientes que en otros (Ben-Ari y cols., 1997). De hecho, la densidad del receptor plaquetario de membrana CD42b es mayor en pacientes colestásicos que en los no colestásicos (Pihusch R y cols., 2002). Como se sabe, este antígeno es parte del receptor plaquetario de adhesión GP Ib/V/IX que se une al factor von Willebrand (vWF) y es internalizado tras la activación plaquetaria. La presencia de estos sitios de unión permite a las plaquetas detener su movimiento en la circulación arterial e



iniciar su proceso de activación de adhesión y posterior agregación (Brass y cols, 2003). Sin embargo, en pacientes con cirrosis de origen alcohólico o viral, lo que se ha descrito es justamente lo contrario, la existencia de un grave defecto de adhesión plaquetaria (Ordinas y cols., 1996).

4.4.1.4 Hiperfibrinolisis

Los individuos con cirrosis pueden presentar un estado de verdadera hiperfibrinolisis como consecuencia de niveles elevados del activador tisular del plasminógeno (t-PA), que aceleran la activación del plasminógeno, y los niveles reducidos del inhibidor de plasmina α -2 y PAI-1 que no pueden antagonizar este proceso, son los responsables del trastorno. Los elevados niveles de t-PA sobre las plaquetas lleva a la inhibición de la agregación plaquetaria, degradación de receptores plaquetarios (GP Ib y GP IIb/IIIa) y a la inducción de la desagregación plaquetaria (Radosavljevic, 2007). La hiperfibrinolisis ocurre en aproximadamente un 30 % de los pacientes con cirrosis y es posible que esté correlacionada con la severidad de la enfermedad. En pacientes con ascitis al parecer el estado hiperfibrinolítico también aumenta, ya que el incremento de la actividad fibrinolítica ha sido detectado en el fluido ascítico, con elevados niveles de D-dímero y productos de degradación del fibrinógeno (Agawal y cols., 2000; Radosavljevic, 2007).

4.4.1.5 Disfibrinogemia

Es la producción de un fibrinógeno cualitativamente anormal debido a su contenido excesivo de ácido siálico; cuantitativamente la determinación de fibrinógeno es normal, pero la fibrina que se forma es defectuosa y no polimeriza. (López y cols., 2008).

4.4.2 DISFUNCIÓN PLAQUETARIA

4.4.2.1 Trombocitopenia

La trombocitopenia es observada entre un 15 a un 70 % de pacientes con cirrosis, dependiendo del estado de la enfermedad y de la definición de la trombocitopenia, y es generalmente de leve a moderada (Peck-Radosavljevic, 2000). Está asociada con otras anormalidades de la coagulación (niveles de fibrinógeno y actividad de factores de coagulación disminuidos e incremento de actividad fibrinolítica) y todas estas anormalidades pueden incrementar el riesgo de sangrado en pacientes con cirrosis (Peck-Radosavljevic, 2007).

Múltiples mecanismos patogénicos contribuyen a la disminución del número de plaquetas circulantes. Esto incluye la esplenomegalia secundaria a la hipertensión portal y subsecuentemente al secuestro de plaquetas en el bazo, reducción de la producción hepática de trombopoyetina, represión de la médula ósea por el virus de la hepatitis C o por el tratamiento anti-viral con interferón, y aumento de la destrucción plaquetaria

mediada por la participación de mecanismos inmunes antiplaquetarios (Peck-Radosavljevic, 2007). Si se trata de una hepatopatía alcohólica, la trombocitopenia puede ser de causa central por déficit de ácido fólico o por acción tóxica del alcohol sobre los megacariocitos medulares (López y cols., 2008).

4.4.2.2 Alteraciones intrínsecas de las plaquetas

Antes la cirrosis era considerada como un estado hipoagregable, ya que las pruebas de laboratorio que evalúan la agregación no contemplan todos los factores que intervienen *in vivo*. Pero lo que ocurre, es que en el ajuste de la insuficiencia hepática, tanto los factores pro como anti-agregantes pueden alterarse en diferente grado, dando lugar a distintas alteraciones funcionales, según el tipo de patología hepática.

En la figura 15, resumimos la respuesta de una plaqueta normal a los agonistas. La estimulación por colágeno, trombina, ADP y TXA/B₂, lleva a la activación de la PLC. Esto resulta en la formación de DAG e IP₃. DAG lleva a la activación de la PLA₂ y a la producción y aumento de TXA/B₂. Esto refuerza la actividad de la PLC y estimula plaquetas adicionales. El IP₃ produce la liberación de Ca²⁺ del STD (a través de la bomba SERCA). El aumento de Ca²⁺ citosólico (también añadido por el ADP, P₂X-receptor y el intercambiador H⁺/Ca²⁺-Na⁺) modera la activación de las plaquetas: el cambio de forma (por la actina); la liberación de moléculas pro-agregantes de los almacenes (ATP y 5HT de los cuerpos densos y BTG, PF4 y P-selectina de los gránulos alfa) reclutan otras plaquetas y el cambio conformacional del receptor de la GPIIb/IIIa (junto con la fosforilación por PKC) permitiendo la interacción con la fibrina reforzando el coágulo hemostático. Estos mecanismos están bajo un estrecho control homeostático de las vías inhibitorias: el AMPc (está producido por la AC: estimulado por la Adenosina, PGI₂ y PGE₂ e inhibida por ADP vía P2Y2-receptor) y el GMPc (producido por la GC NO-estimulado) (Witters y cols., 2008).

En la cirrosis hepática se han descrito diferentes alteraciones funcionales de las plaquetas *in vitro*. Se ha visto un decremento de la actividad de la PLC y PLA₂ llevando a una disminución de la producción de TXA/B₂ y disminución del incremento de IP₃ mediado por el Ca²⁺ citosólico. Hay también menos transporte de Ca²⁺ por el H⁺/Ca²⁺-Na⁺-antiporter, debido a la disminución de acidificación intraplaquetaria. Hay un deterioro en la liberación de los cuerpos densos y gránulos alfa, ya que es menos efectivo debido a que el pool de almacenaje es defectuosos: menos niveles de ATP y 5HT; BTG, PF4 y P-selectina en los gránulos respectivamente. Las vías inhibitorias están también sobre-reguladas. Esto resulta en más inhibición mediada por AMPc y GMPc (Witters y cols., 2008). Este defecto en la señalización transmembrana (y secundario a una disminución de los mensajeros intracelulares), se piensan que es el factor más importante en la hipofunción plaquetaria (Laffi y cols., 1995; Witters y cols., 2008) (Fig. 15 A).

Además de estos factores intrínsecos defectuosos, hay también factores plasmáticos que pueden disminuir la activación plaquetaria como son los productos de degradación del fibrinógeno (FDP) y la ApoE o las sales biliares. Estudios de agregación *in vitro* muestran el efecto inhibitorio de las sales biliares y aumento de serotonina inducida por ADP o colágeno. De las sales biliares, únicamente el ácido quenodesoxicólico es capaz de inducir la agregación (Baele y cols., 1988; Witters y cols., 2008).

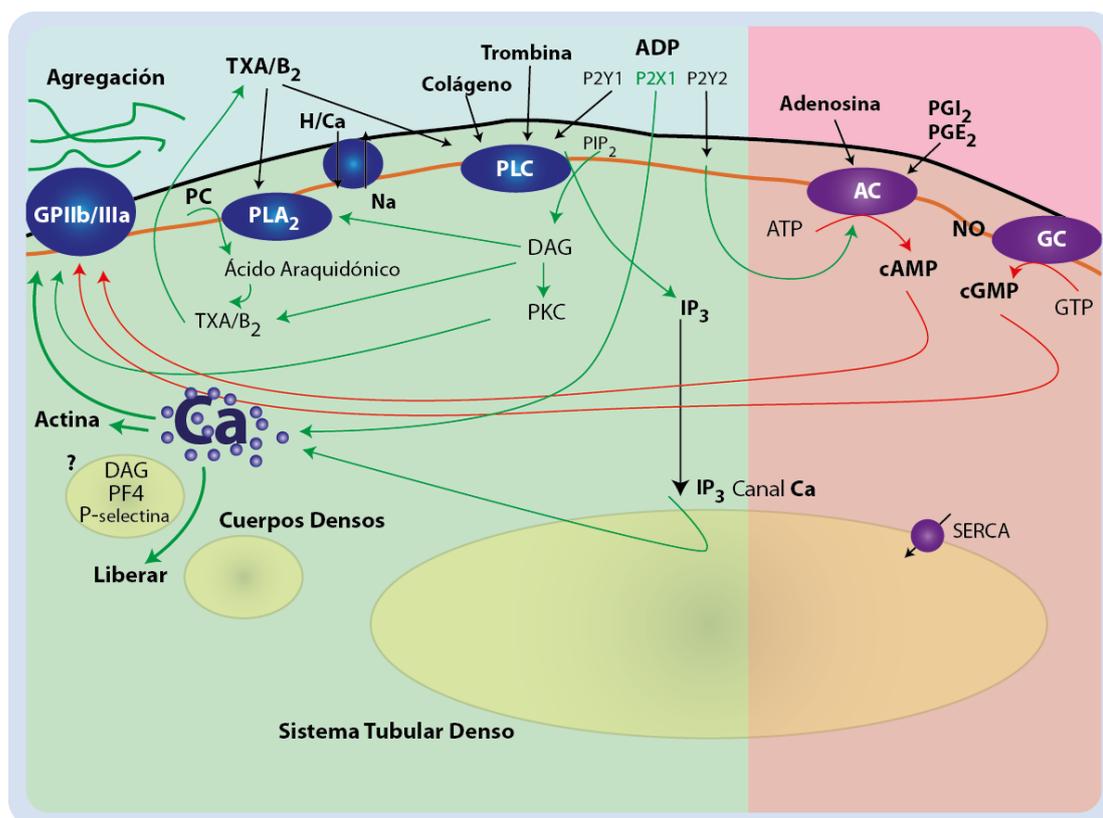


Figura 15: Mecanismos que regulan la concentración plasmática de Ca^{2+} en las plaquetas. (lado rojo derecho, vías inhibitorias serotonina (5HT); adenilato ciclasa (AC); Apolipoproteína E (ApoE); adenosina-trifosfato (ATP); b-thromboglobulin (BTG); Ca^{2+} (Ca); adenosina monofosfato cíclico (AMPc); guanósina monofosfato cíclico (GMPc); diacilglicerol (DAG); productos de degradación del fibrinógeno; GPIIb / IIIa; guanósina trifosfato (GTP); hidrógeno (H^+); inositol-trifosfato (IP_3); sodio (Na^+); óxido nítrico (NO); receptores del ADP: P2Y1, P2X1, P2TY2; fosfatidilcolina (PC); factor plaquetario 4 (PF4); prostaglandina E_2 (PGE_2); prostaciclina I_2 (PGI_2); fosfatidil inositol-bisfosfato (PIP_2); proteína quinasa C (PKC); fosfolipasa A_2 (PLA_2); fosfolipasa C (PLC); retículo sarco-endoplasmático Ca^{2+} -ATPasa (SERCA); tromboxano A_2 (TXA_2); tromboxano B_2 (TXB_2), guanilato ciclasa (GC) (Witters y cols., 2008).

Estudios sobre alteraciones funcionales producidas en la cirrosis hepática de origen alcohólico, son difíciles de interpretar porque interviene el efecto tóxico del etanol sobre las plaquetas. El etanol tiene efectos directos sobre los lípidos plaquetarios, el sistema de segundos mensajeros (mediado por AMPc, IP_3 y DAG) y el sistema PLA_2 , lo que produce una alteración de la agregabilidad, pudiendo tener un efecto inhibitorio (Torres y col., 1995; Witters y cols., 2008). Pero no todos los estudios están de acuerdo, ya que se ha visto que la producción de TXB_2 está elevada en estos pacientes, lo que indicaría una

hiperagregabilidad *in vivo*, posiblemente contribuyendo a la trombocitopenia que se desarrolla a largo plazo en estos pacientes (Witters y cols., 2008).

Por otro lado, un incremento en la generación de trombina en la circulación, podría aumentar la agregación en la cirrosis. El aumento de la trombina, debido a un fallo del circuito de retro-alimentación de trombina/trombomodulina negativa, a través de la proteína C-activa y además el aumento del factor VIII, podría amplificar la señalización de la PAR-1 (receptor del ADP), haciendo que no solo haya una respuesta sostenida de la activación plaquetaria, sino también un papel en la génesis de la fibrosis hepática, ya que estudios demuestran que la fibrosis es mejorada por la administración de un antagonista de PAR-1 en ratones Knockout para PAR-1 y FT (Tripodi y cols., 2011).

Los pacientes con cirrosis biliar primaria tienen menos complicaciones hemorrágicas que los pacientes (en el mismo estadio) con cirrosis de origen alcohólico o viral. La causa no está clara, pero no se ha podido explicar por diferencias en los factores de coagulación o en el número de plaquetas. Se piensa que la función plaquetaria en la cirrosis colestática es más efectiva que en otros desórdenes hepáticos, aunque se desconoce el mecanismo molecular responsable (Pihusch y cols., 2002).

Respecto a este punto, los datos existentes en la literatura indican que hay un defecto en la movilización de Ca^{2+} en respuesta a agonistas como la trombina en pacientes con cirrosis de origen alcohólico o viral (Rodríguez-Pérez y cols., 1993; Laffi y cols., 1993; Bandi y cols., 1997). En el caso de pacientes con cirrosis de origen colestático, no hay artículos publicados al respecto. En nuestro laboratorio se ha trabajado con un modelo experimental de cirrosis biliar, el de la ligadura del conducto biliar (LCB). Los resultados obtenidos, confirman la existencia de alteraciones de la función plaquetaria (Atucha y cols., 2005; Atucha y cols., 2007), que están en concordancia con las disfunciones descritas en la cirrosis biliar humana. Atucha y cols., analizan la señalización de Ca^{2+} de ratas con LCB en la fase previa al desarrollo de ascitis. En estas condiciones, el aumento de Ca^{2+} citoplasmático en respuesta a trombina, probablemente el principal agonista plaquetario, tanto en ausencia como en presencia de Ca^{2+} externo, es mayor en los animales LCB sin ascitis. Esto indicaría que estas plaquetas dispondrían de una mayor cantidad de Ca^{2+} disponible en el momento de su activación.

Respecto a los mecanismos responsables de esta mayor respuesta a trombina del Ca^{2+} intracelular de las plaquetas de ratas con LCB y sin ascitis, los resultados de Atucha y colaboradores (2007) indican que está relacionada con un mayor almacenamiento de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares (Fig. 16A), debido a una mayor actividad de la SERCA (Fig. 16B), que es la encargada de re-captar el Ca^{2+} intracelular tras los estímulos. Curiosamente, a este mecanismo de aumento del almacenamiento en las plaquetas de los animales con cirrosis biliar, puede contribuir también una menor actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Atucha y cols., 2007).

Además de la excesiva liberación de Ca^{2+} intracelular, iniciada por la formación y acción de mediadores intracelulares como IP_3 , estos datos han puesto en evidencia otra alteración de importancia en las plaquetas de los animales con LCB que ya se había descrito previamente en el lecho arterial mesentérico del mismo tipo de animales (Atucha y cols., 2005). Se trata de una menor entrada capacitativa de Ca^{2+} en respuesta a la inhibición de la SERCA. Esta entrada capacitativa, llevada a cabo por canales activados por el vaciamiento de los almacenes, es de gran importancia en plaquetas donde parece ser prácticamente el único que permite la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Rosado y Sage, 2002), y sirve como mecanismo reponedor del Ca^{2+} liberado por el agonista. Esta menor entrada capacitativa puede ser secundaria al mayor llenado de los almacenes intracelulares.

También hay evidencias de un incremento en la expresión de CD42b (un antígeno del GP Ib/V/IX el cual se une al vWF), esto sugiere que las plaquetas son pre-activadas en pacientes CBP. Esto es consistente con los altos niveles del complejo trombina–antitrombina y el incremento de los niveles de homocisteína y FT como señal de la activación endotelial (Biagini y cols., 2006).

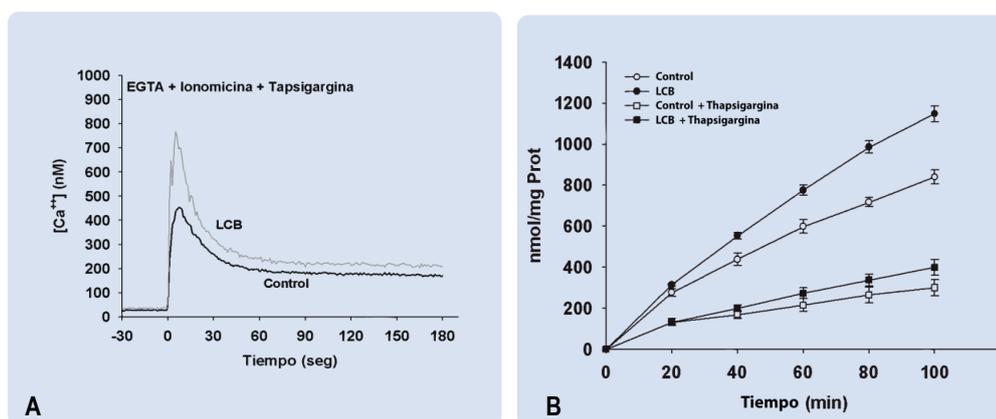


Figura 16. (A) El Ca^{2+} total liberable es mayor en las plaquetas de las ratas LCB que en los controles; (B) la actividad enzimática de la SERCA es mayor en microsomas de plaquetas de ratas LCB que en los controles (Atucha y cols., 2005).

4.4.3 INSUFICIENCIA RENAL

Habitualmente está presente en las hepatopatías avanzadas, desequilibra la hemostasia hacia una tendencia hemorrágica, debido a una disfunción plaquetaria adquirida, una anormal interacción endotelio-plaqueta y la anemia (López y col., 2008).

4.4.4 INFECCIONES

Las endotoxinas bacterianas pueden activar la cascada de coagulación y estar involucradas en el CID. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las endotoxinas también pueden inhibir la coagulación, estimulando la generación de una sustancia endógena, la heparina, en la cirrosis. Las endotoxinas y la sepsis estimulan la liberación de heparinoides por las células endoteliales y los mastocitos. Además puede producir trombopenia y disfunción plaquetaria mediada por un aumento de NO (Thalheimer y cols., 2005).

4.4.5 CITOQUINAS Y CIRROSIS

La cirrosis hepática representa el estadio final de un proceso de inflamación crónica, activación inmunitaria crónica y fibrogénica en el hígado. Esta activación obedece tanto al proceso inmunológico e inflamatorio local hepático como a las consecuencias sistémicas de la cirrosis hepática. No es impensable, por lo tanto, que valores séricos elevados de diversas citoquinas: las interleucinas 1, 2 y 6, el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral (TNF), se encuentren elevados en la cirrosis hepática y se incrementen con el empeoramiento de la función hepática (Genesca y col., 2004).

Las citoquinas son moléculas polipeptídicas o glicoproteicas segregadas por células específicas, que median la inter-relación entre las células, se les ha identificado como un mecanismo esencial de comunicación, tanto en condiciones normales como de defensa ante diversos agentes (Luna, 1995; Campas y col., 1992). Las citoquinas usualmente actúan en el organismo, a través de receptores específicos por los que presentan alta afinidad. Pueden interactuar de una manera positiva o negativa a distintos niveles, tanto por inter-regulación entre ellas como por respuesta de las células sobre las que actúan (Andus y cols., 1991).

Las citoquinas son producidas, fundamentalmente, por los monocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por los leucocitos polinucleares, células endoteliales, epiteliales y células del tejido conjuntivo. Según la célula que la produzca se denominan linfocinas (linfocitos), monocinas (monocitos), interleucinas (IL) o interleuquinas (células hematopoyéticas) (Escolano, 2008). Su detección en el plasma en cantidades significativas suele suponer un aumento patológico de su generación en el ámbito tisular, ello suele corresponder a estímulos mantenidos en el tiempo, capaces de producir alteraciones en diversos órganos y sistemas, como miocardio, pulmón, hígado, sistema nervioso central o sistema de la coagulación (Hall y cols., 1997; Ruiz, 2010). Por lo tanto desempeñan un papel fundamental como intermediarios en el control y la regulación de los estados pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Es por ello, que se pueden agrupar en 4 grupos funcionales según el lugar o fase específica de la respuesta inmune en la que actúen:



- *Citoquinas pro-inflamatorias*: actúan en la respuesta inmune innata, específica o inflamación. Son: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-12, IL-16, interferon (INF).
- *Citoquinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica*: INF- γ , IL-2.
- *Citoquinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o inmunidad humoral*: IL-4, IL-5, IL-6, IL-13.
- *Citoquinas con funciones extrainmunológicas y/o homeostáticas como hematopoyesis, remodelación ósea, desarrollo embrionario*: IL-3, IL-2, IL-5, IL-1, IL-6 (Escolano, 2008).

Los pacientes con hepatopatías inflamatorias activas (en especial de etiología etílica, presentan manifestaciones de respuesta de fase aguda, con tasas elevadas de **interleuquina-6 (IL-6)** en sangre y sobreproducción del **factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)** (Moller y col., 1992; Tilg y cols., 1992).

INTERLEUQUINA-6 (IL-6)

La IL-6 es una proteína segregada por fibroblastos, monocitos, linfocitos, líneas celulares tumorales y células endoteliales, (García Allut, 2000), pero también se ha encontrado que esta expresa intensamente en el hígado, tanto en las células inflamatorias que infiltran los espacios portales como en las células endoteliales de los sinusoides próximos a los hepatocitos dañados, en las células de Ito e incluso en los mismos hepatocitos (Lanser y col., 1989; Annani y cols., 1992; Greenwel y cols., 1993). Pero también sabemos que es el hígado el lugar principal de depuración de la mayoría de las citoquinas, y entre ellas está la IL-6 (Quesenberry, 1992).

Entre sus múltiples funciones, se ha encontrado que actúa en la hematopoyesis, en la respuesta inmune, donde participa en la regulación de los linfocitos (T y B) (Kishimata, 1989; Calmus y cols., 1992) y en la respuesta de fase aguda, donde es la principal inductora de la misma (Heinrich y cols., 1990). Además, participa en la respuesta inflamatoria, en la infección (localizada en cavidad peritoneal o sistémica) (Calandra y cols., 1991), en el metabolismo óseo y en el crecimiento de algunas líneas de linfomas (Greenwel y cols., 1993; Lanser y col., 1989; Muraguchi y cols., 1981; Houghlum y cols., 1994).

Es considerada una proteína pro-inflamatoria importante, ya que es secretada en grandes cantidades tras el TNF y la IL-1, después de la inducción con lipopolisacáridos (LPS) o durante infecciones agudas (Elias y cols., 1991; García Allut, 2000). Se ha encontrado que la IL-6 estimula directamente la formación de colonias de granulocitos-macrófagos y de megacariocitos, por lo tanto es un estimulador para la producción de plaquetas (Quesenberry, 1992). Hay evidencias que la IL-6 juega un papel importante en el desarrollo de la trombocitosis reactiva, causada por la inflamación, y un efecto estimulante sobre la megacariocitopoyesis (Kimura y cols., 1990; Fernandez-Real y cols., 2001). Además se demostró que

la IL-6 aumenta la agregación inducida por agonistas y la secreción de tromboxano B₂ (TXB₂) en un mecanismo que envuelve al ácido araquidónico (Oleksowicz y cols., 1994)

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria, mediadora de distintos procesos beneficiosos (defensa del hospedador, respuesta inmune y homeostasis de los tejidos) y también de procesos negativos (patogénesis de infecciones, daño tisular, inflamación y otros) (Camussi y cols., 1991).

El TNF- α es producido principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales (García Allut, 2000). Es capaz de inducir la expresión de genes de otras citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8, PAF y el de sí mismo (Ryden y col., 2007; Lin y cols., 2008). Disminuye la transcripción genética del colágeno α 1, en fibroblastos humanos, en linfocitos y en otras líneas celulares (Solís-Herruzo y cols., 1988; Mauviel y cols., 1991; Armendariz-Borunda y cols., 1992). Es un potente quimiotáctico con propiedades estimulantes del metabolismo oxidativo. Induce la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) (Frangogiannis y cols., 2002; Ruiz, 2010) y la secreción de O₂⁻, H₂O₂ y otros metabolitos tóxicos (Yoshimura y cols., 1990; Ruiz, 2010).

Además disminuye la secreción de NO por el endotelio (Ruiz, 2010) y es capaz de producir trombosis intravascular, principalmente debido a una pérdida de las propiedades anticoagulantes normales del endotelio. El TNF- α estimula en las células endoteliales la expresión del FT (estimula la coagulación), e inhibe la expresión de la trombomodulina (inhibidor de la coagulación). Estas alteraciones endoteliales aumentan por la activación de los neutrófilos, la cual da lugar al taponamiento vascular por estas células (Aledo, 2009).

4.4.6 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

La vasodilatación arterial, sobre todo en la circulación esplácnica, es un importante factor patogénico para la circulación hiperdinámica en la cirrosis. También hay deficiencias en la contractilidad vascular con hipo-reactividad a vasoconstrictores debido a la superproducción de NO (su principal fuente está en la NO sintasa endotelial: eNOS), además de otros mecanismos (Atucha y cols., 1994; Gillet y cols., 1995). Esta sobreproducción puede alterar las funciones de las biomoléculas, especialmente de las proteínas probablemente como resultado de la nitración; demostrándose que en las plaquetas de pacientes con cirrosis, las proteínas citosólicas y citoesqueléticas estaban considerablemente nitradas. Por lo tanto los niveles de nitrito parecen tener una correlación positiva con el nivel de nitroproteínas en diferentes grados de cirrosis, así que los niveles de nitroproteínas en el plasma, plaquetas y tejido hepático puede ser correlacionado con la severidad de la cirrosis hepática (Jeyachristy y cols., 2009).



La translocación bacteriana (o paso de las bacterias y/o sus endotoxinas a través de la pared intestinal hacia tejidos u órganos) junto con la circulación porto-sistémica (nuevas conexiones entre vasos) y la depuración hepática reducida, lleva a las bacterias, endotoxinas y citoquinas a la circulación sistémica, por lo tanto aumenta la producción de NO en animales cirróticos y humanos. Esto último se produce a través de un efecto estimulante de la endotoxina, y la endotoxina inducida por la secreción de citoquinas como el TNF- α a través de GTP-ciclohidrolasa I, el cual aumenta la síntesis de la tetrahydrobiopterina (un cofactor esencial en la síntesis del NO). Este aumento de NO agrava aún más la vasodilatación arterial en la cirrosis (Thalheimer y cols., 2006). Moreau y cols., observaron que las concentraciones de la proteína de unión de lipopolisacárido (LPS), un marcador indirecto de la endotoxemia, se incrementan en un 40 % en cirróticos ascíticos, pero no en cirróticos no ascíticos (Barton, 1997) y que el aumento de las concentraciones de nitratos es debido a la endotoxemia y a la translocación bacteriana, por lo que puede estar relacionado con el empeoramiento de la hipertensión portal y/o la función hepática. Pero también aumenta en pacientes cirróticos ascíticos con insuficiencia renal y son asociadas con una alta actividad de renina, aldosterona y hormona antidiurética (Manna y cols., 1998). Curiosamente, la descontaminación intestinal, puede normalizar los niveles de LPS, reducir los niveles de renina y nitratos y aumentar la resistencia vascular sistémica en pacientes con cirrosis, pero no en normales con LPS (Barton, 1997).

4.4.7 HOMOCISTEÍNA (Hcy)

En 1969, McCully descubrió alteraciones anatomopatológicas vasculares en sujetos con altas concentraciones de Hcy y junto con Wilson propusieron su relación con eventos ateroscleróticos como la disfunción endotelial, estenosis arterial progresiva y trastornos hemostáticos.

La Hcy es un aminoácido azufrado intermediario en el metabolismo de la metionina, aminoácido esencial que, aparte de ser precursor y componente de péptidos y proteínas, desempeña una importante función metabólica al participar en un sistema de transferencia de grupos metilos (García-Tevijano y cols., 2001). La metionina, tras ser activada, cede su grupo metilo en una reacción catalizada por una metil-transferasa (MT), y da lugar a la S-adenosil-homocisteína, y por hidrólisis libera adenosina, y se obtiene Hcy libre (Fig. 17) (Menéndez Cabezas y cols., 1999; Hohammad y cols., 2005).

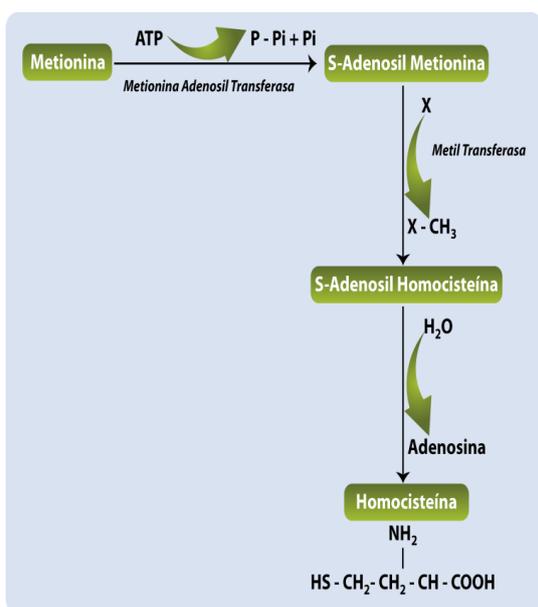


Figura 17: Formación de la Homocisteína a partir de metionina (Menéndez Cabezas y cols., 1999).

La Hcy plasmática se encuentra mayoritariamente unida a proteínas (~75-80 %) plasmáticas y, en menor grado formando dímeros con ella misma y con la cisteína (10 % aprox. en cada dímero), o bien libre en forma reducida (1-2 %). Todo ello forma la llamada **Hcy “total”** (Menéndez Cabezas y cols., 1999). Su forma libre y unida de la Hcy varía entre especies, por ejemplo, en contraste a los humanos, aproximadamente de 65-75 % de Hcy en ratas está en su forma libre (Friedman y col., 2002).

La Hcy es metabolizada en el hígado, fundamentalmente a través de 2 posibles vías: la remetilación y la transulfuración:

4.4.7.1 Vía de remetilación

Permite que la Hcy sea reciclada a metionina, utilizando folatos intracelulares y enzimas. La Hcy se metila mediante la acción de: **a) metionina sintasa** o 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa (**MS**), que cataliza la remetilación en la mayoría de los tejidos. Esta enzima utiliza la vitamina B₁₂ como cofactor y al 5-metiltetrahidrofolato como donante de grupos metilo. A su vez, el metiltetrahidrofolato se forma mediante la acción de la enzima 5,10- metilentetrahidrofolato reductasa (**MTHFR**) dependiente de la vitamina B₂ y **b) betaína-homocisteína-metiltransferasa (BHMT)** que utiliza la betaína como donante de grupos metilo, pero probablemente esta acción está limitada al hígado, riñón y glándulas suprarrenales (Fig. 18) (Aller y cols., 2004). En humanos, aproximadamente el 50 % de la homocisteína es convertida en metionina mediante esta vía, hecho importante en situaciones de baja ingesta proteica (Llorca Escuín, 1998; De Bree y cols., 2002).

La concentración intracelular de Hcy es, en condiciones fisiológicas, muy reducida (1-5 nmol/g). Cuando se aumenta la síntesis de Hcy o se inhibe su catabolismo, aumenta la

salida al espacio extracelular. La tasa a la que se exporta al espacio extracelular refleja el balance entre la síntesis y la utilización eficiente de metionina a través de la remetilación (Llorca Escuín, 1998).

Por esta razón, la concentración extracelular de Hcy, y en particular la del plasma, es un indicador de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de cofactores y sustratos involucrados en su metabolismo. La semivida de la Hcy en la sangre oscila entre 12 y 24 horas.

4.4.7.2 Vía de transulfuración

Representa la alternativa en el caso de que la metionina esté en relativo exceso en el organismo y no se requiera su recuperación, o cuando se necesite la síntesis del aminoácido cisteína. Implica la acción de la **cistationina-β-sintasa (CβS)**, dependiente de la vitamina B₆. Esta enzima se encarga de condensar la Hcy con serina para formar la cistationina, que posteriormente por la acción de la cistationina-γ-liasa (γ-CT), se escinde en cisteína y α-acetobutirato. La cisteína así generada puede utilizarse en la síntesis de proteínas o como precursor del antioxidante glutatión. Este proceso de transulfuración es irreversible y dirige la Hcy al catabolismo hacia su producto final, los sulfatos (Fig. 18) (Aller y cols., 2004).

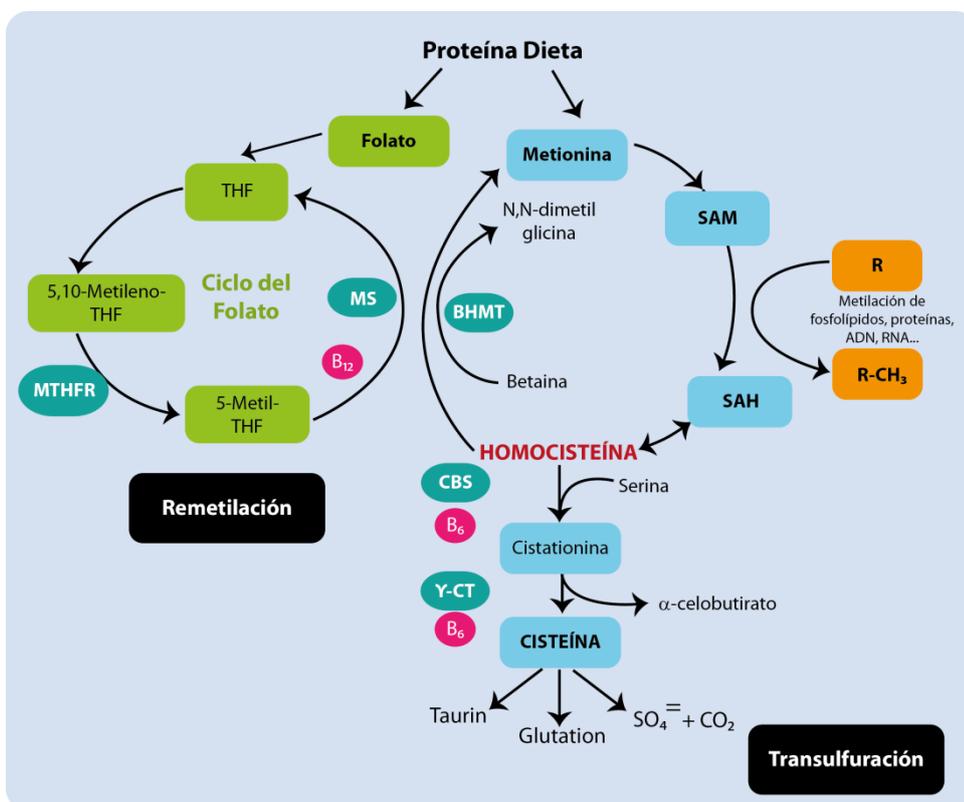


Figura 18: Metabolismo de la Homocisteína. Metionina Sintasa (MS), 5-10 metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR), Cistationina β-sintasa (CβS), Betaina-homocisteína-metiltransferasa (BHMT), tetrahidrofolato (THF), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), cistationina-γ liasa (γ-CT) (Llorca Escuín, 1998).

4.4.8 HIPERHOMOCISTEINEMIA (HHcy) EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

En general se acepta que los determinantes de la alta concentración de Hcy plasmática son complejos e incluyen factores muy diversos de carácter demográfico, genético (homocistinuria), adquiridos y que tiene que ver con el estilo de vida.

Las concentraciones de Hcy "total" en ayunas, según diferentes autores de distintos países, oscilan entre 5 y 16 $\mu\text{mol/L}$ (Menéndez y col., 1999; De Bree y cols., 2002; Mohammad y cols., 2005). Se han clasificado la HHcy como leve con concentraciones de 12 a 30 $\mu\text{mol/L}$, intermedia 31 a 100 y grave por encima de 100 $\mu\text{mol/L}$ (Friedman y col., 2002).

Si bien la HHcy severa ($>100 \mu\text{mol/L}$) es infrecuente, la forma leve ocurre aproximadamente en el 5-7 % de la población. En pacientes con elevaciones moderadas de Hcy, la aterosclerosis comienza a manifestarse a la tercera o a la cuarta década de la vida con la presencia de la enfermedad coronaria prematura y episodios de trombosis venosa o arterial recurrente. En aquellos con enfermedad vascular aterosclerótica sintomática la prevalencia de HHcy oscila del 13 % al 47 % (Hawkinson, 2002).

Varios estudios han demostrado que existe un aumento de Hcy en el plasma de pacientes con cirrosis de cualquier etiología, así como en el hígado no cirrótico enfermo. Por ello la HHcy se asoció con el curso de la enfermedad del hígado y del daño al riñón, siendo más pronunciado en los estados avanzados de la cirrosis, puesto que el hígado va perdiendo su integridad como órgano provocando un desbalance de macro y micronutrientes (Bosy y cols., 2003; García-Tevijano y cols., 2004; Hohammad y cols., 2005). Por lo tanto, en los pacientes cirróticos, la HHcy es debida, en la mayoría de los casos, a una mala absorción de vitaminas B, que son requeridas por el metabolismo de la Hcy. Pero también los fármacos pueden interferir con el metabolismo de estas vitaminas y producir HHcy (Selhud y cols., 1993). Es por ello, que al paciente cirrótico se le proporciona normalmente una dieta rica en vitaminas del grupo B (ácido fólico, B₆, y B₁₂), y proteínas preferiblemente de origen vegetal por ser pobres en aminoácidos aromáticos, amoniaco y mercaptanos (Fernández, 2003).

La HHcy comienza a aparecer cuando la velocidad de filtración glomerular desciende por debajo de 70 mL/min, la mayoría de los pacientes con alteraciones en la función renal presentan niveles plasmáticos aumentados de Hcy total (tHcy). También se ha observado una correlación negativa entre la tHcy y la velocidad de filtración glomerular. Así el síndrome nefrítico parece estar asociado con una reducción de los niveles plasmáticos de Hcy. El mecanismo implicado aún no se conoce pero parece estar causado por el incremento de la pérdida de proteínas plasmáticas en orina, entre ellas, las proteínas de unión a la Hcy (Chazot y cols., 2004). Del mismo modo existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de tHcy y la valoración subjetiva del estado nutricional global (teniendo en cuenta que una puntuación elevada indica malnutrición), lo que sugiere que la malnutrición influye en los niveles plasmáticos de tHcy (Sánchez y cols., 2007): la ingesta de proteína (metionina) es determinante en la concentración



plasmática de tHcy. De este modo, el estado nutricional y albúmina sérica afectan de manera independiente sobre los niveles de tHcy.

4.4.8.1 Patogenia de la HHcy

El mecanismo patológico por el cual la HHcy promueve las alteraciones aterotrombóticas vasculares, no es completamente conocido. El daño endotelial que puede llevar a la alteración en la producción de NO dañando la actividad plaquetaria ha sido demostrada por varios estudios (Bosy y cols., 2003; Lentz, 2005).

a. Disfunción endotelial

Definida como un impedimento en la relajación endotelio-dependiente de vasos sanguíneos, es un efecto característico de muchos factores de riesgo cardiovascular, incluyendo la hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes. También ocurre una vaso-relajación anormal, en humanos, cuando se induce una HHcy aguda mediante la administración de una carga de metionina oral. El grado de daño en la función endotelial durante la HHcy es similar a la observada con otros factores de riesgo como la hipertensión e hipercolesterolemia (Weiss y cols., 2002a).

También se ha examinado la disfunción endotelial en las arteriolas cerebrales (~30 μm de diámetro basal) de ratones con homocigocidad y heterocigocidad para el gen de la CBS (*Cbs* +/+ y *Cbs* +/-) con una dieta alta en metionina, la dilatación en respuesta a la acetilcolina fue significativamente dañada con esta dieta, comparadas con los controles de ratones tanto *Cbs* +/+ como *Cbs* +/- (Weiss y cols., 2002b). La concentración plasmática de Hcy total asociado con la disfunción endotelial en las arteriolas del cerebro (10-15 μM) fue considerada más baja que la necesaria para producir disfunción endotelial en la aorta (20-30 μM) lo cual sugiere que pequeñas arteriolas cerebrales son más sensibles a los efectos cardiovasculares de una suave HHcy que en los grandes vasos como la aorta (De Bree y cols., 2002; Gerdes y cols., 2004). También se ha observado que ratones deficientes en CBS, exhiben una gran disfunción endotelial de arteriolas cerebrales y mesentéricas, hecho también observado en ratones heterocigotos MTHFR-deficientes (Dayal y cols., 2005).

Estos estudios muestran aparentemente que el desarrollo de la disfunción endotelial y la HHcy en ratones esta correlacionada también con el grado de elevación en el plasma de Hcy total, a pesar de la combinación específica de factores genéticos o dieta usados para producir HHcy, sugieren que es la Hcy en si misma o su relación con otros metabolitos, responsable de la disfunción endotelial (De Bree y cols., 2002; Gerdes y cols., 2004; Lentz, 2005).

- Óxido Nítrico (NO): La Hcy reacciona con el NO en presencia de oxígeno, formando el S-nitroso-homocisteína el cual tiene algunas propiedades del NO, ya que es vasodilatador (Fig. 19), representando un mecanismo de defensa contra los efectos de la Hcy. Pero cuando las células endoteliales son expuestas

mucho tiempo a la Hcy, puede producir una disminución de la disponibilidad de NO por dos vías: por alteración de su síntesis, directamente o mediado por especies reactivas de oxígeno o por productos de la peroxidación lipídica, y por agotamiento del gas ya formado al aumentar la posibilidad de formar S-nitrosohomocisteína, con lo cual se crea una especie de círculo vicioso que agrava aún más el daño oxidativo (generando potentes especies reactivas) y bloquea el efecto vasodilatador de este mensajero químico (Cabezas, 1999; Thombyjeh y col., 2000; Riba y col., 2004; Mohammad y cols., 2005).

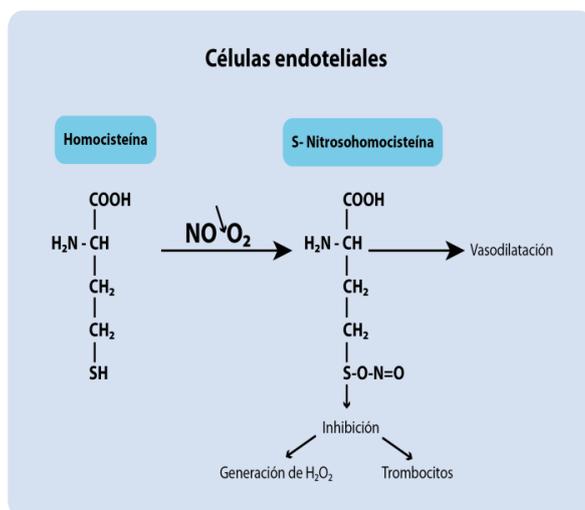


Figura 19: Reacción de la Hcy con el NO (Cabezas y cols., 1999).

También se ha encontrado que la dilatación de arteriolas cerebrales con acetilcolina en ratas *Cbs+/+* o *Cbs+/-* alimentadas con una dieta rica en metionina se restaura hacia valores normales por la neutralización del superóxido, lo cual sugiere que el superóxido es el mayor mediador de la disfunción endotelial en ratones HHcy (Thombyjeh y col., 2000).

Sin embargo, en las células musculares lisas la Hcy tiene otro efecto. Welch y colaboradores encontraron que la homocisteína promueve directamente o mediada por ROS el aumento de la producción de NO en estas células por inducción de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS 2), mediada por el factor nuclear de transcripción (NFκB) lo cual indica la acción mitogénica que tiene la Hcy, ya que este factor promueve la proliferación de las células musculares lisas en cultivo (Bellas y Sonenshein, 1995; Cabezas, 1999).

- **Estrés oxidativo:** Una de las primeras hipótesis por la cual la HHcy produce estrés oxidativo es por la auto-oxidación de su grupo tiol altamente reactivo y, a su vez, forma especies reactivas de oxígeno. Pero esto no explica cómo la cisteína (que se encuentra en cantidades superiores a la Hcy) que también se puede auto-oxidar no causa daño endotelial (Nuño-Ayala y cols., 2010). Pero la HHcy puede generar estrés oxidativo por otros mecanismos, como producir el descenso de la expresión de la glutatión peroxidasa (GPx), enzima que cataliza la



reducción de radicales, lo que impediría la inactivación del ion superóxido, de forma que este ion podría reaccionar con el NO y formar peroxinitrito. La consecuencia, sería la menor disponibilidad del NO para la vasodilatación (Loscalzo, 1996; Thombyjeh y cols., 2000). A esto se le agrega que la HHcy aumenta los niveles de la dimetil arginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El ADMA compite con la L-arginina que es el sustrato de la eNOS y la consecuencia es una menor producción de NO (Lentz y cols., 2003). Por otro lado la Hcy puede incrementar el estrés oxidativo inhibiendo la expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD), produciendo de esta manera un aumento del anión superóxido y de los peroxinitritos. Estos radicales contribuyen a la generación de peróxidos lipídicos y a la modificación de proteínas mediante la nitración del aminoácido tirosina (Young y cols., 1997).

- **Inflamación:** Se ha puesto en manifiesto que la HHcy induce la producción de diversas moléculas pro-inflamatorias. Se ha demostrado que el tratamiento de células del endotelio vascular, células del músculo liso y monocitos con Hcy induce la expresión de IL-8, VCAM-1, E-Selectina y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), aumenta la unión de los monocitos al endotelio y su reclutamiento hacia el espacio sub-endotelial, un paso crítico en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Wang y cols., 2002). Además, la inducción de IL-8 y MCP-1 se produce a través de la activación de NFκB, un factor de transcripción que estimula la producción de citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, que a su vez contribuyen a la lesión vascular. Por último la Hcy incrementa la expresión de TNF- α que conlleva a la estimulación de otros genes inflamatorios e inhibición de la vasoconstricción con la consiguiente alteración de la función endotelial (Ungavari y cols., 2003; Nuño-Ayala y cols., 2010).

b. Alteración en la coagulación

Como se ha comentado previamente, a pesar de que hay evidencias de la relación que existe entre la Hcy y la enfermedad cardiovascular, el mecanismo por el cual la Hcy produce disfunción endotelial y aterosclerosis no ha sido bien definido. Evidencias experimentales indican que la injuria endotelial es el cambio patológico más importante en el desarrollo de la enfermedad aterotrombótica vascular, involucrando la estimulación de las plaquetas (Leoncini y cols., 2003).

Experimentos realizados en ratones con HHcy, muestran un aumento de sensibilidad a experimentar trombosis, de manera que la oclusión trombótica de la arteria carótida ocurre un 50% más rápidamente en ratones heterocigotos hiperhomocisteinémicos que en ratones normales. Varios estudios han demostrado que la HHcy estimula los mecanismos de agregación plaquetaria, entre ellos destaca un aumento en la síntesis de tromboxano A₂ (Minno y cols., 1993), activación de los factores V y XII (Rodgers y Kane, 1986; Rodgers y Connon, 1990), aumento de la actividad del factor tisular (FT) que promueve la coagulación en ausencia de trombina (Fryer y cols., 1993) y un aumento en la

secreción del factor von Willebrand (García y cols., 2001; Denis y cols., 2003; Nuño-Ayala y cols., 2010). Por otra parte, la Hcy inhibe también importantes vías fisiológicas anticoagulantes, como son la activación de la proteína C y la expresión de la trombomodulina en la superficie endotelial (Rodgers y Conn, 1990). Además se han encontrado alteraciones en la unión con la antitrombina III y la reducción de la unión del activador tisular del plasminógeno (t-PA) (Hajjar, 1993, Nuño-Ayala y cols., 2010).

En babuinos con HHcy, la formación de una lesión, pero no el daño endotelial, fue reducido con una terapia anti-plaquetaria, sugiriendo que la Hcy inducida, estimula el daño endotelial, incrementando el aumento de factores mitogénicos derivados de plaquetas los cuales resultan en la proliferación del músculo liso (Thombyjeh y col., 2000).

Riba en el 2004 encontró por primera vez en pacientes HHcy que la sensibilidad al NO exógeno en las plaquetas está significativamente disminuido comparado con pacientes con una HHcy suave; el mecanismo por el cual ejerce este efecto aun es desconocido, pero probablemente envuelve cambios en la función celular más que influenciando la bio-disponibilidad del NO (Riba y cols., 2004). Es decir las plaquetas en sí mismas, están funcionalmente alteradas por la Hcy elevada y es independiente de los efectos sobre el endotelio, por lo tanto es un importante factor que contribuye a aumentar el multifactorial riesgo aterotrombótico en paciente con HHcy.

Como sabemos, el ión Ca^{2+} es muy importante para la activación plaquetaria, pero el mecanismo por el cual la Hcy activa la entrada de Ca^{2+} es pobremente conocida. El tratamiento de las plaquetas con Hcy incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular y promueve la activación de la proteína quinasa C (Leoncini y cols., 2007), contribuyendo a la asociación de la fosfolipasa citosólica A_2 (cPLA₂) con la membrana de las plaquetas. Entonces la Hcy (dosis dependiente) aumenta la fosforilación de la cPLA₂ y la activación en las plaquetas a través de la p38 MAPK y que estos efectos están estrechamente relacionados con el aumento de Ca^{2+} intracelular, llevando a un aumento del AA y formación del TXB₂ resultando en un incremento en la agregación y secreción (Leoncini y cols., 2003; Leoncini y cols., 2007).

También, Leoncini y colaboradores encuentran que la Hcy disminuye la formación de NO en las plaquetas, incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular y potenciando la agregación inducida por trombina. Argumentando que el transporte de L-arginina, precursor del NO, esta modulado por los niveles de Ca^{2+} intracelular, donde la elevación de Ca^{2+} inhibe el transporte de la L-arginina; y que la Hcy incrementa el Ca^{2+} intracelular a través de una depleción de los almacenes de Ca^{2+} intracelular, sugiriendo un probable rol del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (Leoncini y cols., 2003).

Según otro estudio, la Hcy a concentraciones entre 50 a 200 μ M, altera la liberación y entrada de Ca^{2+} inducida por trombina en la plaqueta y en células endoteliales del cordón umbilical, debido a que la Hcy es capaz de inhibir la polimerización de la actina. Esta reorganización de la actina, así como la remodelación microtubular, ha sido ampliamente demostrada, ser requerida para la activación de la entrada y secreción de Ca^{2+} por los

almacenes en plaquetas y en otras células no excitables (Zang y cols., 2005; Nicoleta y cols., 2007). Entonces la Hcy, *per se*, es capaz de activar la entrada de Ca^{2+} a través de dos fases: primero por un incremento lento, pero sostenido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, seguido de un rápido incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta última fase puede estar mediada posiblemente por el estrés oxidativo o por activación de vías secretorias que lleven a un aumento de agonistas plaquetarios (Redondo y cols., 2004; Nicoleta y cols., 2007). En la figura 20 se resumen los efectos potenciales que tiene la Hcy en el equilibrio fisiológico.

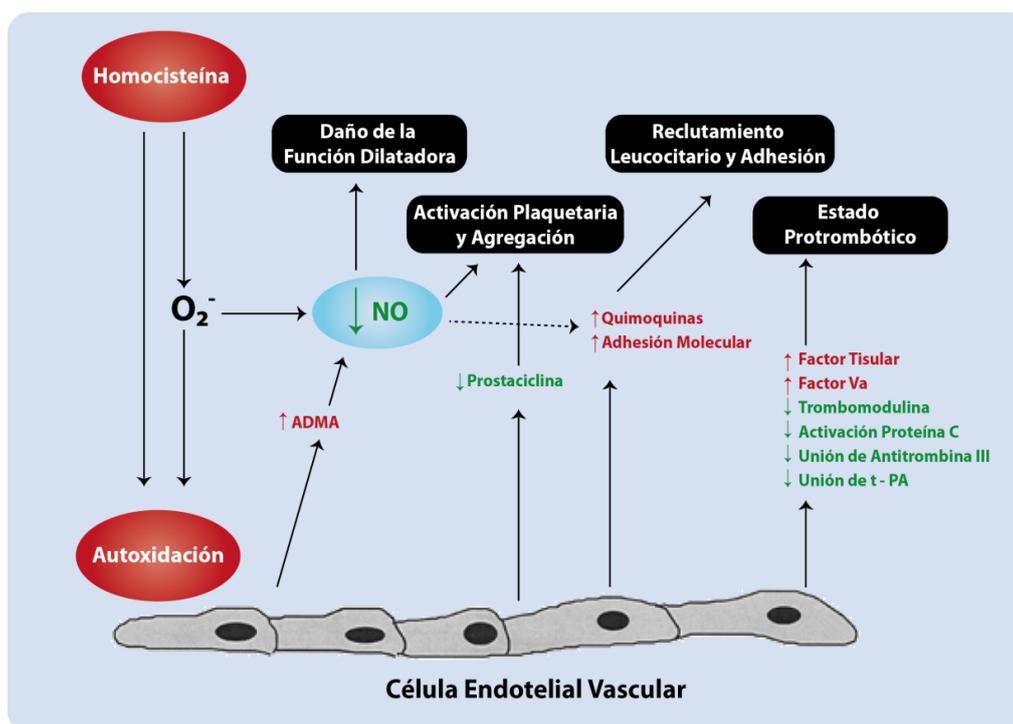
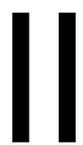


Figura 20: Posibles mecanismos y efectos de la Hcy. La exposición de las células endoteliales a la Hcy conduce a la reducción de la biodisponibilidad del NO que resulta en el deterioro de la función vasodilatadora, dependiente del endotelio. Esto puede ser consecuencia de la oxidación e inactivación del NO por radicales libres que se forman durante la auto-oxidación de la Hcy y/o se acumulan como consecuencia de la inhibición de enzimas antioxidantes o por aumento de la síntesis endotelial de ADM. La disminución de NO, promueve la activación y agregación plaquetaria. Elevados niveles de Hcy inducen la expresión de varias citoquinas y moléculas de adhesión por las células endoteliales que llevan al reclutamiento y adhesión de células inflamatorias circulantes. La Hcy también puede además promover la trombosis por activación de mecanismos pro-trombóticos endotelio-dependiente, tal como la expresión del factor tisular (FT) o de la actividad del factor Va y por la inhibición de mecanismos anti-trombóticos y anti-fibrinolíticos (Weiss y cols., 2002).





PLANTEAMIENTO



Es bien conocido que la insuficiencia hepática produce una importante coagulopatía (Bosh y col., 2005). El origen de esta coagulopatía no está completamente aclarado, aunque se habla de una defectuosa síntesis hepática de factores de la coagulación, alteraciones de la función plaquetaria, trombocitopenia a consecuencia de la hipertensión portal e hiperfibrinólisis, entre otras. Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que las plaquetas de animales con cirrosis biliar, secundaria a la ligadura del conducto biliar, en la fase previa al desarrollo de ascitis, muestran una entrada y movilización aumentada del Ca^{2+} intracelular. Esto parece ser secundario a un mayor almacenamiento intracelular de calcio como consecuencia de la mayor actividad de la Ca^{2+} ATP-asa del retículo endoplásmico (SERCA). Así mismo, experimentos obtenidos en plaquetas de pacientes con cirrosis biliar dan resultados similares, que sugieren una hiperestimulación plaquetaria en este tipo de cirrosis, a diferencia de la cirrosis alcohólica.

Este trabajo está dirigido a la investigación de los mecanismos moleculares responsables de estas alteraciones en plaquetas de animales con cirrosis biliar sin ascitis, así como a determinar el tipo y grado de las alteraciones de la función plaquetaria en la fase de descompensación higrópica que caracteriza a la fase ascítica.

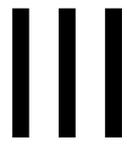
En primera instancia evaluaremos la función plaquetaria midiendo la **agregación *in vitro*** de plaquetas de animales controles y cirróticos y a la vez, la expresión en la membrana plaquetaria de la **P-selectina**, marcador del grado de activación plaquetaria. De esta manera relacionaremos ambos parámetros en diferentes situaciones: basalmente, tras estimulación con los agonistas usuales, y tras la incubación con factores plasmáticos (homocisteína, ácidos biliares y citoquinas) reguladores de la función plaquetaria. Sabemos que en pacientes con cirrosis biliar parece existir una mayor expresión de este receptor en condiciones basales, lo que sugiere una hiperestimulación plaquetaria. Este aspecto no se ha estudiado en el modelo experimental, al igual que la relación entre este receptor de activación (P-selectina) y los cambios en el **Ca^{2+} intracelular** y la producción de **especies reactivas de oxígeno (ROS)**.

También evaluaremos el papel de algunos **factores plasmáticos**, en la fisiopatología de las alteraciones plaquetarias de la cirrosis. Así, analizaremos si la Hcy o los ácidos biliares modifican la señalización de Ca^{2+} de las plaquetas de animales controles y cirróticos. En este sentido, se ha comprobado que los ácidos biliares tienen efectos sobre el Ca^{2+} intracelular compatibles con los descritos en este proyecto en células endoteliales y en fibroblastos (Nakajima y cols., 2000; Lau y cols., 2005). En cuanto a la Hcy, aunque se tienen datos sobre su efecto en plaquetas y movilización de Ca^{2+} intracelular, pero en diabetes mellitus (Alexandru y cols., 2008), en plaquetas con enfermedad hepática no hay datos conocidos. Otro posible factor es el NO, un mediador local ampliamente reconocido como participante en la fisiopatología de las alteraciones cardiovasculares de la cirrosis hepática (Criado y cols., 1997; Atucha y cols., 2005). En apoyo de esta posibilidad,

resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, usando citometría de flujo en plaquetas cargadas con DAF-2, un fluorocromo que detecta los niveles de NO, nos indican que las plaquetas de ratas con LCB y sin ascitis producen más NO en respuesta a trombina que las plaquetas de animales controles. Nuestro grupo ha descrito, en experimentos realizados en plaquetas de animales con hipertensión arterial por déficit de NO (Iyu y cols., 2004), resultados diametralmente opuestos a los obtenidos en los animales cirróticos. El análisis de la literatura también apoya la hipótesis de que el NO puede estar jugando un papel decisivo en estas alteraciones (Trepakova y cols., 1997; Dedkova y cols., 2002), al aumentar la recaptación de Ca^{2+} por los almacenes.

Varios estudios señalan el papel aterogénico que tiene la Hcy, en una variedad de enfermedades cardiovasculares, donde uno de los blancos celulares principales son las plaquetas ya que éstas, además de las células endoteliales y leucocitarias son esenciales para la formación del trombo (Nuño-Ayala y cols., 2010). Se conoce poco acerca de los efectos y mecanismos de la Hcy promoviendo el daño vascular y la aterotrombosis. Y dado que la HHcy es uno de los factores plasmáticos predominantes en la enfermedad hepática, hemos evaluado si el tratamiento crónico con ácido fólico, podría mejorar la función plaquetaria en la cirrosis biliar., dado que esta vitamina es esencial en la homeostasis de la homocisteína.

La metodología que se empleó para dicho planteamiento es el análisis de la agregación plaquetaria (**medición de absorbancia óptica**) en respuesta a agonistas, la medida del Ca^{2+} intracelular y sus principales mecanismos de regulación, así como la producción de especies reactivas de oxígeno, mediante el uso de la **espectrofluorimetría** (fura-2AM para la medición de Ca^{2+} y CM-H₂DCFDA-acetyl ester para ROS), en plaquetas lavadas de animales controles y cirróticos por ligadura del conducto biliar. La medida del receptor de activación plaquetaria en respuesta a factores plasmáticos y agonistas se realizó mediante **citometría de flujo**.



OBJETIVOS



1. Analizar la agregación plaquetaria, expresión de P-selectina, movilización del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plaquetas de ratas con LCB con ausencia y presencia de ascitis.
2. Estudiar el papel del óxido nítrico (NO), mediante la inhibición crónica de su síntesis con L-NAME o tras la reducción de su disponibilidad con butionina sulfoximina (BSO), en la movilización del Ca^{2+} intracelular, en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis.
3. Estudiar el papel de los ácidos biliares (ácido desoxicólico y quenodesoxicólico) en la movilización del Ca^{2+} y expresión del receptor de activación (P-selectina), en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis.
4. Estudiar el papel de la homocisteína (Hcy) en la agregación plaquetaria, expresión de P-selectina, movilización del Ca^{2+} intracelular y producción de especies reactivas de oxígeno, en plaquetas de ratas LCB con ausencia y presencia de ascitis, mediante el tratamiento crónico con ácido fólico.



IV

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE ESTUDIO

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley (SD) macho y con un peso aproximado entre 240-300 gramos. Se mantuvieron a temperatura ambiente de 25 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron suministrados por el Servicio de Animalario de la Universidad de Murcia.

Todos los experimentos realizados se han llevado a cabo según las normas éticas que dispone la Unión Europea para el trato de los animales de laboratorio según la Ley Española del Real Decreto 1201/2005 (BOE, 2005). El modelo de cirrosis experimental utilizado fue el de Cirrosis Biliar Secundaria por Ligadura crónica del Conducto Biliar (LCB).

1.1 GRUPOS EXPERIMENTALES

Para este trabajo se utilizaron tres grupos experimentales: Controles, LCB sin ascitis (15 y 21 días) y LCB con ascitis (>21 días); una parte de los animales de cada grupo fueron sometidos a tratamiento crónico con ácido fólico (8 mg/Kg/día), en el agua de bebida, iniciándose el tratamiento tres días antes de la ligadura del conducto biliar u operación simulada (Lee y cols., 2004). De igual manera, algunos animales fueron tratados crónicamente con L-NAME (1 mg/Kg/día) en el agua de bebida (solo para el protocolo de la medición del calcio plaquetario); el resto de los animales no recibieron tratamiento alguno. En la tabla 1, se detalla el número de animales empleados en cada grupo experimental según el tratamiento recibido.

Tabla 1: Distribución del número de animales según su tratamiento

Grupos Experimentales	Controles (n)	LCB (15 y 21d) sin ascitis (n)	LCB (21d) con ascitis (n)
1. Sin tratamiento	96	78	64
2. Tratamiento crónico con Ac. Fólico	43	44	61
3. Tratamiento crónico con L-NAME	10	10	

En la tabla 2 se resume el número de animales en cada grupo experimental, según los ensayos realizados.

Tabla 2: Distribución del número de animales de estudio para los ensayos experimentales

Ensayos	Controles (n)	LCB (15 y 21d) sin ascitis (n)	LCB (21d) con ascitis (n)
1. Agregación	40	37	32
2. Medición de Calcio	70	62	37
3. Medición de Radicales Libres (RL)	21	13	19
4. Expresión de receptor de activación plaquetaria	6	7	6

2. *LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR (LCB)*

Tanto para la realización de la ligadura del conducto biliar, como para la extracción de la sangre, las ratas fueron anestesiadas previamente con una mezcla 1:1 de Ketamina (50 mg/mL ®Imalgene, casa Pfizer) y Clorhidrato de Xilacina (20 mg/mL ®Rompún, casa Bayer), a una dosis de 5 mg/Kg de ketamina y 2 mg/Kg de xilacina, intramuscular.

Una vez anestesiado el animal y en condiciones de asepsia, se le somete a una laparotomía media de unos pocos centímetros (2-3 cm) por debajo de la apófisis xifoides. Con unos bastoncillos se levanta uno de los lóbulos hepáticos y se localiza el conducto biliar, surgiendo del hígado un conducto doble que posteriormente se une (conducto biliar principal) desembocando en el duodeno. Una vez aislado el conducto principal, se ligan los extremos distal y proximal y se corta el tramo entre ambas ligaduras. Finalmente se coloca el hígado en su sitio y se cierra la laparotomía por capas usando una sutura de puntos continuos para la capa muscular y de puntos sueltos para cerrar la piel. Los animales se dejan recuperar en una jaula limpia y con una fuente de calor hasta que se despiertan de la anestesia. Transcurridos aproximadamente 15 días tras la operación se manifiestan los primeros signos de fibrosis hepática y entre los 21 y 28 días el 75 % aproximadamente de las ratas intervenidas, tienen una cirrosis establecida (Kountouras y cols., 1984). Los animales control (o Sham) fueron sometidas a una operación simulada.



3. ENSAYOS EXPERIMENTALES

Para llevar a cabo los objetivos propuestos, se ha estudiado la homeostasis del calcio intracelular en plaquetas lavadas y la agregación en plasma rico en plaquetas de animales controles y con LCB. A continuación se exponen los ensayos realizados:

Ensayo 1: MEDICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Ensayo 2: MEDICIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR EN PLAQUETAS LAVADAS

- a. Liberación del calcio intracelular
- b. Entrada de calcio extracelular
- c. Niveles totales de calcio plaquetario
- d. Entrada Capacitativa (ECC)
- e. Entrada Capacitativa con medición de una tercera longitud de onda

Ensayo 3: MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Ensayo 4: MEDICIÓN DE RECEPTORES DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Ensayo 5: MEDICIÓN DE HOMOCISTEÍNA EN PLASMA

3.1 ENSAYO 1

3.1.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA

3.1.1.1 Principio del ensayo: MÉTODO TURBIMÉTRICO

La agregación plaquetaria es la interacción plaqueta-plaqueta y para que se produzca es necesario que las plaquetas conserven su integridad metabólica, dado que este proceso incluye cambios morfológicos y químicos. La medición de la agregación plaquetaria fue descrita en 1962 por Born, como una técnica para estimar la cinética de la agregación de las plaquetas por medio de la turbidimetría (medición de turbidez o densidad óptica). Este método se convirtió de manera rápida en el patrón de referencia para el estudio de la función plaquetaria.

Este estudio mide en tiempo real la agregación del plasma rico en plaquetas (PRP), mediante el aclaramiento óptico. Esta prueba requiere un agregómetro (o espectrofotómetro) en el que se deposita la muestra de PRP en una cubeta de incubación a 37 °C, que se encuentra entre una fuente de luz y una foto-celda de medición que calcula la densidad óptica o turbidez del PRP. La preparación del PRP requiere la separación de las

plaquetas del resto de las células de la sangre por medio de centrifugaciones lentas; también requiere de la preparación del plasma pobre en plaquetas (PPP) por medio de centrifugaciones rápidas, para ajustar el número de plaquetas por tubo.

Conforme las plaquetas se agregan en respuesta a un agonista (ADP, colágeno y otros), el PRP se aclara y se transmite mayor cantidad de luz, esta transmisión se mide en tiempo real y se grafica el porcentaje del aclaramiento de la muestra: a mayor agregación plaquetaria, mayor transmisión de la luz y viceversa (Fig. 1) (Seegmiller y Sarode, 2007).

Su representación gráfica genera una curva de agregación plaquetaria que se puede medir por el porcentaje máximo de agregación y también por área de agregación en el tiempo (Fig. 2B). La curva típica de agregación tiene 3 fases distintas después de añadir el agonista: un incremento inicial, un ligero descenso de la curva, por el cambio de forma de las plaquetas, y un incremento agudo o agregación máxima (Fig. 1b, c, d). Este último incremento puede tener dos fases más, dependiendo del tipo de agonista y/o su concentración, generando una curva u onda primaria y secundaria (Pluma y cols., 2011).

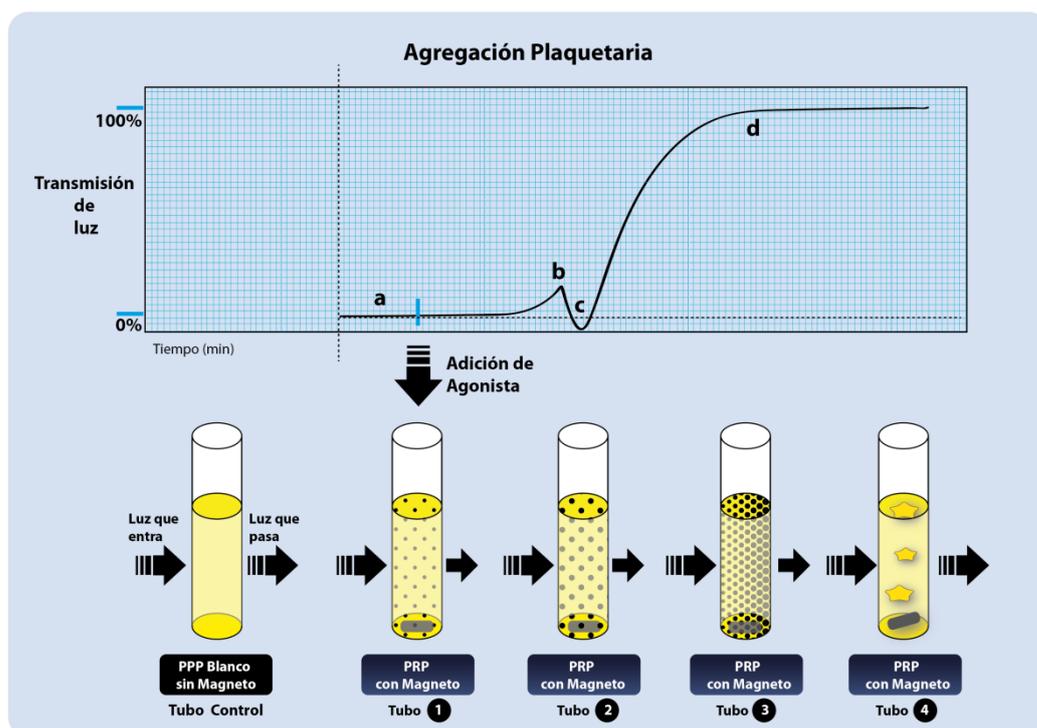


Figura 1: Esquema de la agregación plaquetaria según el principio de Born. Tubo control con plasma pobre en plaquetas (PPP), **Tubo 1:** falta de transmisión de la luz a través del plasma turbio (a: línea en continuo); se induce la agregación plaquetaria con la adición de un agonista (ADP). **Tubo 2:** un incremento inicial de la transmisión de luz atribuible a dilución del PRP por el agonista que se añade (b: pequeño incremento de la curva). **Tubo 3:** discreta disminución de la transmisión conforme las plaquetas cambian de forma (c: ligero descenso de la curva). **Tubo 4:** incremento agudo de la transmisión conforme las plaquetas se agregan (d: máximo incremento de la curva) (figura adaptada de: Pluma y cols., 2011; www.practical-haemostasis.com).

Los principales inductores (agonistas) de la agregación “*in vitro*” son el ADP, epinefrina, colágeno y trombina, todos ellos fisiológicos y el araquidonato sódico, que es un agente agregante artificial. También han sido clasificados como fuertes y débiles, los fuertes son capaces de inducir secreción con independencia de una agregación completa y generalmente con independencia de la producción de tromboxano por las plaquetas. Los débiles son incapaces de inducir secreción sin previa agregación y requieren de la síntesis de tromboxano. El agonista fuerte por excelencia es la trombina, mientras que la epinefrina es débil.

El ADP o colágeno funcionan como fuertes o débiles dependiendo de su concentración (Zucker y col., 2007; Shapiro, 1999; Patel y cols., 2005). Es decir, con una concentración de ADP a 2 μM , se pueden ver unas ondas de agregación primaria y secundaria, claramente definidas (Fig. 2A). La primera representa el efecto directo inducido por el agonista y la segunda onda se debe a la liberación de ADP endógeno y a la generación de tromboxano A_2 (TXA_2). Por debajo de 2 μM , existe menos respuesta secundaria y la onda primaria frecuentemente se invierte cuando el ADP se degrada enzimáticamente. Por encima de 3 μM la fase primaria suele ser tan intensa que la distinción entre ésta y la fase secundaria queda enmascarada (Fig. 2B) (Kitchen y col., 1998).

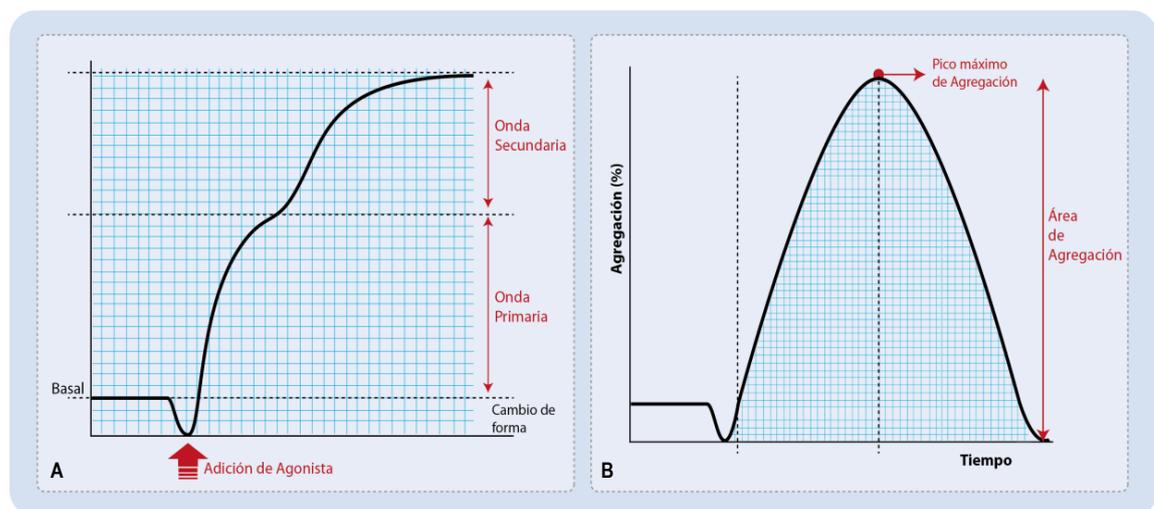


Figura 2: Curvas de agregación plaquetaria. (A) Muestra los eventos bifásicos de una agregación tras añadir ADP a bajas concentraciones, describe una onda primaria los primeros minutos, seguidos de una onda secundaria, tras la liberación de ADP endógeno y tromboxano A_2 (TXA_2). (B) Con otros agonistas como la Trombina no es posible distinguir estas dos fases. Se registra el pico máximo de agregación y también el área bajo la curva vs tiempo (adaptada de: www.practical-haemostasis.com).

3.1.2 PROTOCOLO*

3.1.2.1 Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Una vez anestesiada la rata, como se ha mencionado anteriormente, se le realiza una laparotomía media desde la pelvis a la apófisis xifoides, se retiran los intestinos y el tejido conectivo hasta aislar la vena cava y la aorta abdominal. Para canular la aorta, se interrumpe el flujo sanguíneo de la arteria transitoriamente con un clamp y se procede a su canulación. Rápidamente, se retira el clamp y se recogen aproximadamente 10 mL de sangre en 2 tubos de ensayo de plástico que contienen el anticoagulante (citrato 3 %: 500 µl/4,5 mL sangre) a temperatura ambiente (T^a).

Tras la extracción de la sangre se procede a centrifugar la muestra a 124 g/20 min/20 °C de la que obtendremos el sobrenadante, que es el PRP. El resto de la muestra se volvió a centrifugar a 1750 g/10 min/20 °C, para la obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP).

3.1.2.2 Agregación plaquetaria

- a. El plasma rico en plaquetas (PRP), se mantuvo en un baño a 20 °C hasta la realización de la medición, para evitar el deterioro de las plaquetas.
- b. Se realizó el recuento plaquetario del PRP en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), para luego ajustarla con PPP autólogo y obtener una muestra final con aprox. 3×10^5 cel/µl.
- c. La agregación plaquetaria fue determinada en un agregómetro (Aggrecoeder PA 3210) por el método turbimétrico de Born. Se vertieron 200 µl de la muestra final a las cubetas siliconadas del agregómetro, más 25 µl del agonista en estudio, ADP ($5 \mu\text{M}$)_f[♦]. Las muestras se pre-incubaron durante 5 minutos a 37 °C. En el momento de añadir el ADP, las muestras se agitan a 194 g (1000 rpm).
- d. En el caso de los experimentos en los que se evaluó el papel de la Homocisteína o Cisteína (control), se añadieron otros 25 µl de éstos (tabla 3), y tras la incubación, se indujo la agregación plaquetaria por adición de ADP.

* La composición y el modo de preparación de todos los reactivos se encuentran en Anexos.

♦ ()_f: significa la concentración final que hay en la muestra.

Tabla 3: Concentraciones de los agonistas para la agregación

Agonistas	Concentraciones de trabajo	Concentraciones en la muestra
Cisteína	100 μ M	10 μ M
y	250 μ M	25 μ M
Homocisteína	500 μ M	50 μ M
	1 mM	100 μ M

3.1.2.3 Cálculos de la Agregación

Los resultados fueron expresados como área bajo la curva (mm^2) y el pico de la curva como porcentaje máximo de agregación (%) (Fig. 2B), que se produjo en 10 minutos, como medida relativa de la amplitud del incremento en la transmisión de luz a través de la muestra. El área bajo la curva fue medida con una cámara de video Sony 151 AP conectada a un equipo de análisis de imagen Q-550 MC Leica.

3.2 ENSAYO 2

3.2.1 MEDICIÓN DEL Ca^{2+} INTRACELULAR CON FURA 2-AM

3.2.1.1 Principio del ensayo

Para este ensayo se utilizó el fluorímetro o espectrofluorímetro que utiliza las propiedades fluorescentes de ciertas partículas para conocer la concentración de las mismas en una muestra (Lorente, 1991). El instrumento permite excitar una muestra a una longitud de onda determinada para posteriormente recoger la emisión de fluorescencia a una cierta longitud de onda o todo un espectro. Existen diversas fuentes de excitación como el láser, lámparas de vapor de mercurio, fotodiodos; en nuestro caso se utilizó una lámpara de xenón que tiene un espectro de emisión continuo y de intensidad constante entre 300 y 800 nm (Gullapalli y col., 2010).

La luz pasa por un filtro o monocromador que permite seleccionar la longitud de onda de interés. Posteriormente la luz pasa por la muestra, por un segundo monocromador, que nos permitirá seleccionar la longitud de onda o el espectro que nos interesa obtener, y será recogida por un fotomultiplicador o un fotodiodo. Como se puede observar en la figura 3, la medida de fluorescencia de la muestra se recoge a 90° de la fuente de excitación, esto se realiza para intentar minimizar la interferencia producida por la fuente en el sensor y que este recoja exclusivamente los valores de

fluorescencia, que se emiten en todas direcciones, de la muestra y no los de la emisión de la fuente, todo esto se encuentra conectado a un sistema de lectura para un análisis cuantitativo (Gullapalli y col., 2010 y Rodríguez, 2010).

La intensidad depende de la concentración del fluoróforo en la muestra a bajas concentraciones; sin embargo para altas concentraciones los fluoróforos comienzan a reaccionar y a formar compuestos no fluorescentes por lo que los valores de intensidad recogidos comienzan a disminuir. Otro factor importante es que la cubeta donde va la muestra sea clara y sin impurezas, para que no afecte la lectura del fluorímetro; dependiendo de la longitud de onda de excitación, pueden ser de diferentes materiales (cuarzo o plástico) (Rodríguez, 2010).

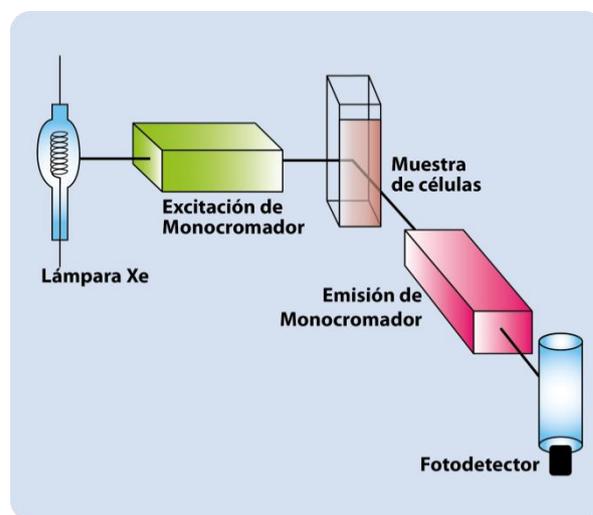


Figura 3: Esquema del fluorímetro (Wether, 2009).

El desarrollo de indicadores fluorescentes en los estudios de la homeostasis del Ca^{2+} celular se debe principalmente a Tsien y colaboradores en los años 80. Estos autores popularizaron el uso del indicador fura-2AM, para los estudios de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y contribuyeron al desarrollo de nuevas sondas útiles en estudios de la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por hormonas y otros agonistas.

El fura-2AM es la sonda fluorescente más empleada para medir los niveles de Ca^{2+} , tiene una mayor constante de disociación (K_d) para el calcio, menor sensibilidad al magnesio y es más foto estable que otras. El fura-2AM se usa para medir concentraciones intracelulares del orden de micromolar ya que su K_d para el calcio está entre 150-225 nM. El principal problema que presenta esta sonda es que la forma acetoxi-metil éster (AM) (forma de carga en las células) no se hidroliza completamente y además tiene tendencia a compartimentalizarse en orgánulos sub-celulares durante el proceso de carga. Cuando el fura-2AM se une al calcio, su máximo de excitación se desplaza hacia bajas longitudes de

onda, con un desplazamiento despreciable de la emisión máxima. Esto permite que el fura-2AM sea utilizado como un indicador de doble excitación.

El fura-2AM libre se excita a 380 nm mientras que la forma unida al calcio se excita a 340 nm y emiten ambas a 510 nm (Fig. 4A), de manera que cuando existe un **aumento** de calcio intracelular la fluorescencia emitida por la forma unida al Ca^{2+} aumenta y en cambio la de la forma libre de Ca^{2+} disminuye (Fig. 4B), ocurriendo justo lo contrario cuando el Ca^{2+} intracelular **disminuye**. La relación entre ambas longitudes de onda del fura-2AM unida como libre al Ca^{2+} puede calcularse en una relación o **ratio**.

La ratio nos permite minimizar una serie de artefactos que provocan cambios en la intensidad de la fluorescencia, que no se deben a cambios en la concentración de calcio y por lo tanto es una medida independiente de la concentración de fluorocromo en la célula.

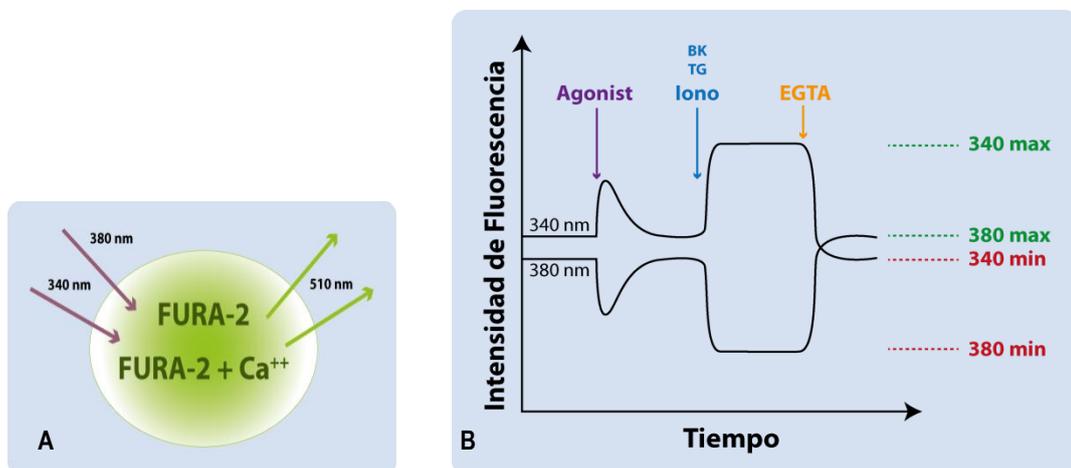


Figura 4: Esquema del registro del Ca^{2+} por el Fluorímetro. (A) fura-2 libre (excitación a 380 nm), fura-2 unida a Ca^{2+} (excitación a 340 nm), ambos emiten a 510 nm (B) Representación de fura-2 unido y libre de Ca^{2+} tras el estímulo con agonistas (adaptada de: <http://www.biomed.cas>).

3.2.2 PROTOCOLO

3.2.2.1 Preparación del fura-2AM (fluorocromo)

El Fura-2AM es un éster hidrofóbico de elevado peso molecular, que presenta muy baja solubilidad en medios acuosos, pudiendo incluso precipitar. Para aumentar su solubilidad en dichos medios, se utiliza un surfactante no iónico llamado **ácido plurónico**, que actúa como una micela, secuestrando el éster en su interior, evitando así la agregación y precipitación de este (lo que haría imposible la entrada del fluorocromo en la célula) y actuando, por otro lado, como una fuente constante de fluorocromo para la misma.

En la preparación del fura-2AM se evitó la luz directa, para ello cubrimos el tubo de ensayo con papel aluminio y se trabajó en una habitación con muy poca luz. Los pasos a seguir son:

- Se mezclan muy bien 2 μL de ácido plurónico y 1 μL de fura-2AM (2,5 mM).
- Se añade 1 mL de Tampón-2* y se agita enérgicamente.
- Se añaden 50 mg de albúmina y se agita suavemente para no formar espuma.

3.2.2.2 Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) para la medición de calcio intracelular

Para la obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se procedió de la misma forma que para la agregación, pero los 10 mL de sangre se recogieron en dos tubos de ensayo con una solución anticoagulante de: ácido cítrico (52 mM)_f, citrato sódico (80 mM)_f y glucosa (180 mM)_f, que denominamos ACG (850 μL /5 mL de muestra). Además se adicionó a la sangre apirasa (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)_f (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de muestra) y Prostaglandina E₁ (PGE₁) (50 μM)_f (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de muestra), para evitar que las posteriores manipulaciones de la muestra activen a las plaquetas.

3.2.2.3 Lavado de plaquetas

Es necesario separar las plaquetas del plasma y lavarlas, debido a que el plasma de la rata es rico en esterases que desesterificaría al fura-2AM, disminuyendo la captación de éste por parte de la célula. Para ello, el PRP (con apirasa[♦] 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de muestra y PGE₁[♦] 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de muestra) se volvió a centrifugar a 941 g/8 min/20 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 1 mL de Tampón-1* más la apirasa[♦] y PGE₁[♦]. La acidificación del medio, así como la adición de estas dos sustancias químicas ayudan a evitar la activación de las plaquetas durante su centrifugación y manipulación.

3.2.2.4 Carga con fura-2 AM

- a. Las plaquetas se volvieron a centrifugar a 941 g/8 min/20 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido con 1 mL de Tampón-2 que previamente se preparó (en el punto 3.2.2.1) ya cargado con fura-2AM (2,5 μM)_f.
- b. Las plaquetas se incubaron en un baño a 20 °C/45 min en la oscuridad, con agitación suave cada 10 minutos, para ayudar a que el fluorocromo penetre en las plaquetas.

* (Tampón 1 y 2): su composición está detallada en el apartado de anexos.

♦ Para todo el protocolo se usó las concentraciones de: apirasa (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)_f y PGE₁ (50 μM)_f



- c. En este periodo se realizó el conteo celular, en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), para trabajar con la misma concentración de plaquetas (3×10^5 cel/ μ l) y determinar el número de experimentos a realizar en el espectrofluorímetro (aproximadamente para 5 mL de sangre extraída se realizaron entre 10-12 experimentos).
- d. Después de la incubación se añadió 2 mL del Tampón-1, más apirasa[♦] y se centrifugó a 941 g/8 min/20 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con la cantidad adecuada de Tampón-2.
- e. Tras 30 minutos (para permitir que se produzca la desesterificación del fura por las esterasas intracelulares), y 10 minutos antes de empezar el experimento se le adicionó Ca^{2+} ($100 \mu\text{M}$)_f como concentración final en la muestra. De esta manera nos aseguramos que los almacenes de calcio intracelulares estén llenos.

Durante todo el proceso, las plaquetas cargadas con fura-2AM se protegen de la luz.

3.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DEL Ca^{2+}

La medida de Ca^{2+} se realizó en un espectrofluorímetro (*Fluorimeter Spectronic Unicam*) con 3×10^5 plaquetas/mL de Tampón-2 a 37 °C y se procedió a la realización de los siguientes experimentos:

3.2.3.1 Liberación de Ca^{2+} intracelular

Las plaquetas cargadas con fura-2AM (50 μ l en 1950 μ l de Tampón-2 a 37 °C), se depositaron en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos EGTA ($200 \mu\text{M}$)_f a la muestra, para conseguir un medio extracelular libre de Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 30 segundos, añadimos la trombina (Tr) a una concentración final de (0,1 y 0,3 U/mL)_f o ADP ($5 \mu\text{M}$)_f y seguimos registrando la señal de fluorescencia durante 180 segundos.



3.2.3.2 Entrada de Ca^{2+} extracelular

Las plaquetas cargadas con fura-2 AM (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 37 °C), se depositaron en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos CaCl_2 (1 mM)_f para conseguir un medio extracelular con Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 30 segundos, añadimos la trombina a una concentración final de (0,1-0,3 U/mL)_f o ADP (5 μM)_f y registramos la señal de fluorescencia durante 180 segundos.



3.2.3.3 Niveles totales de Ca^{2+} plaquetario

Para estudiar la cantidad de Ca^{2+} almacenada en los depósitos internos, las plaquetas cargadas con fura-2AM, se depositaron en la cubeta de medida, a continuación añadimos EGTA (200 μM)_f, para conseguir un medio extracelular libre de Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 30 segundos y añadimos tapsigargina (TG) (1 μM)_f, para el bloqueo de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico, mas ionomicina (Iono) (5 μM)_f, para la liberación de Ca^{2+} citoplasmático y registramos la señal de fluorescencia durante 180 segundos.



3.2.3.4 Entrada capacitativa del Ca^{2+}

Las plaquetas cargadas con fura-2AM, se depositaron en la cubeta de medida, a continuación añadimos EGTA (200 μM)_f para conseguir un medio extracelular libre de Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 30 segundos y añadimos tapsigargina (TG) (1 μM)_f y/o ter-butyl-benzohidroquinona (TBHQ) (2 μM)_f, para el bloqueo de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico, registramos la señal de fluorescencia durante 180 segundos, luego se le adicionó CaCl_2 (0,5 mM)_f y la fluorescencia resultante se registró durante otros 180 segundos.



3.2.3.5 Entrada capacitativa del Ca^{2+} con registro de una tercera longitud de onda (360nm)

Debido a que el fura-2AM tiene un punto isobéptico (punto de iso fluorescencia) a 360 nm, la medida a esta longitud de onda es útil para monitorizar la fluorescencia no dependiente de Ca^{2+} o para apreciar el “quenching” o la pérdida de fluorescencia cuando el fura-2AM se une a metales pesados como el Manganese (Mn^{2+}). Es decir, cuando el Mn^{2+} entra con el Ca^{2+} , en la entrada capacitativa, elimina la fluorescencia del fura-2 AM, por lo que podemos así valorar el grado de activación o apertura de estos canales.

Este protocolo es igual al anterior, excepto que se registró con una tercera longitud de onda de 360 nm y al final se añadió $\text{Cl}_2 \text{Mn}$ (100 μM)_f.



3.2.3.6 Calibración

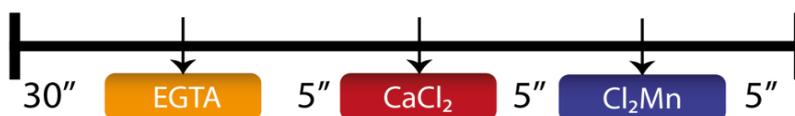
Se realizó la calibración en cada animal para poder relacionar los cálculos de los cambios de fluorescencia de las plaquetas con los cambios de concentración de $[\text{Ca}^{+2}]_i$. Las plaquetas cargadas con fura-2AM (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 37 °C), son depositadas en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos: CaCl_2 (2 mM)_f, se registró 5 segundos y se le añadió tritón (0,1 %)_f, se registró otros 5 segundos y se le añadió EGTA-Tris, se registraron otros 5 segundos y se le añadió MnCl_2 (40mM)_f.

- **CaCl_2 (2 mM)_f**: le aporta al medio el calcio necesario para que pueda penetrar en la célula.
- **Tritón (0,1 %)_f**: es un ionóforo que se encarga de crear poros en la membrana plasmática de las células, por lo que entran grandes cantidades de calcio desde el exterior de la célula al interior.
- **EGTA-Tris (160 mM)_f**: es un quelante del calcio, es decir, se une al Ca^{2+} , impidiendo que el catión se una al fura y acidificando el medio, pero el Tris-base aumenta los protones del EGTA^{2-} manteniendo el pH del medio a nivel inicial.
- **MnCl_2 (40 mM)_f**: es una sustancia que secuestra al fura, por lo que hace que disminuya la fluorescencia hasta el nivel de autofluorescencia, es decir toda la fluorescencia que no es debida al fura, como la debida al material genético de la célula o a la habitación donde se realizó el experimento.



3.2.3.7 Sobrenadante

Puesto que el fura-2AM tiende a ser eliminado por la célula con el tiempo, este fura-2AM extracelular y el que no entra en la célula, contribuye a la fluorescencia total medida en cada experimento. Por ello, fue necesario determinar la fluorescencia del sobrenadante en ausencia y en presencia de calcio extracelular y tener en cuenta este valor en los cálculos de calcio intracelular. Las plaquetas cargadas con fura-2AM, fueron depositadas en un tubo de ensayo, centrifugadas a 941 g/8 min/20 °C y el sobrenadante fue recogido y su fluorescencia medida en el espectrofluorimetro. La fluorescencia fue medida tras añadir EGTA (200 μM)_f, luego CaCl₂ (1 mM)_f, y finalmente MnCl₂ (1 mM)_f.



3.2.3.8 Cálculo de la concentración de Ca²⁺

Para calibrar las señales de fluorescencia, utilizamos la ratio entre las dos longitudes de onda de excitación del fura-2AM (340-380 nm), para ello necesitamos la relación o ratio máxima (R_{max}) y la relación mínima (R_{min}), así como otros parámetros. La expresión que nos proporciona los valores de concentración de Ca²⁺ utilizando la ratio entre las dos longitudes de onda que excitan al fura-2AM, es:

$$[\text{Ca}^{+2}] = \text{Kd} * \text{Sf} * (\text{R}-\text{Rmin}) / \text{Sb} * (\text{Rmax}-\text{R})$$

Kd, es la constante de disociación del fura-2AM en las condiciones intracelulares, a 37 °C su valor es 224 nM.

R, es el cociente de las lecturas a las longitudes de onda utilizadas (340 y 380 nm).

Sf y **Sb**, son los valores máximos y mínimo de fluorescencia, respectivamente, con la excitación de 380nm, en las condiciones de medio sin calcio y medio saturado de calcio, respectivamente.

Rmax y **Rmin**, son los valores máximo y mínimo de la ratio, en condiciones de saturación de calcio y de medio sin calcio, respectivamente. Son los valores registrados en los experimentos de calibración y sobrenadante (Grynkiewicz y cols., 1985).



3.2.4 EFECTO AGUDO DE FACTORES PLASMÁTICOS SOBRE LAS PLAQUETAS

3.2.4.1 Efecto agudo de la homocisteína (Hcy) en la entrada, liberación y entrada capacitativa del Ca²⁺

Se realizaron los experimentos del 1 al 7 (del apartado 3.2.3), pero con incubación previa de la muestra con Hcy a dos concentraciones distintas (10 y 25 μM)_f durante 5 minutos a 20 °C. Luego, la muestra fue depositada en la cubeta de medida dentro del espectrofluorímetro y se procedió con los experimentos ya indicados.

3.2.4.2 Efecto agudo de los ácidos biliares en la entrada, liberación y entrada capacitativa del Ca²⁺

El experimento se realizó con y sin incubación de la muestra con el ácidodesoxicólico (DC) y el ácido quenodesoxicólico (CDC) a una concentración final de (100 μM)_f, durante 10 minutos a 20 °C. Luego, la muestra fue depositada en la cubeta de medida dentro del espectrofluorímetro y se procedió con los experimentos del 1 al 4, 6 y 7 ya indicados (del apartado 3.2.3).

3.2.4.3 Efecto agudo de la butionina sulfoximina (BSO) en la entrada, liberación de calcio y entrada capacitativa

Para este experimento se separó la muestra de sangre en dos tubos:

Tubo 1: a 5mL de sangre se añadió además de la apirasa y la PGE₁, en las cantidades ya descritas anteriormente, BSO (20 $\mu\text{l}/\text{mL}$ de muestra) (5 mM)_f. Se continuó con el protocolo de obtención de las plaquetas incluyendo carga con el fura-2AM y sus posteriores lavados, siempre añadiendo en cada resuspensión: apirasa, PGE₁ y BSO, excepto en la última resuspensión con el Tampon-2. Finalmente se procedió con los experimentos del 1 al 7 (del apartado 3.2.3).

En el caso de los experimentos que usaron L-NAME para analizar el papel del óxido nítrico, la muestra se incubó previamente con L-NAME (200 μM)_f, durante 10 minutos a 20 °C.

Tubo 2: los 5mL de sangre restantes, fue nuestra muestra control, es decir sin la adición de BSO, solo con apirasa y PGE₁. Tampoco se incubó con L-NAME antes de proceder con los experimentos del 1 al 4 (del apartado 3.2.3).

3.2.4.4 Efecto crónico del L-NAME en la entrada, liberación de Ca²⁺ y entrada capacitativa

Se realizaron los experimentos del 1 al 7 (del apartado 3.2.3), en ratas tratadas crónicamente con L-NAME (1 mg/Kg/día) 7 días antes de realizar el experimento.

3.3 ENSAYO 3

3.3.1 MEDICIÓN INTRACELULAR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS) CON CM-H₂DCFDA-acetil ester

3.3.1.1 Principio del ensayo

El 5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H₂DCFDA-acetil ester) es una sonda sensible a las especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizada para detectar su producción en células vivas. Esta sonda se difunde pasivamente dentro de la célula, donde sus grupos acetato se rompen por las esterasas intracelulares y se oxidan, liberando el correspondiente derivado diclorodihidro-fluoresceína. La oxidación produce una fluorescencia y la señal es recogida, usando un espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm.

3.3.2 PROTOCOLO

3.3.2.1 Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) para la medición de ROS

El protocolo es igual al realizado para la medición del calcio intracelular.

3.3.2.2 Lavado de plaquetas

El protocolo es igual al realizado para la medición del calcio intracelular.

3.3.2.3 Carga con CM-H₂DCFDA-acetyl ester

Las plaquetas se volvieron a centrifugar a 941 g/8 min/20 °C

Las plaquetas se incubaron en un baño a 20 °C/45 min en la oscuridad, con agitación suave cada 10 minutos, para ayudar a que el fluorocromo penetre en las plaquetas.

En este periodo se realizó el conteo celular, para trabajar con la misma concentración de plaquetas y determinar el número de experimentos a realizar en el espectrofluorímetro (aproximadamente para 5 mL de sangre extraída se realizaron entre 10-12 experimentos).



Después de la incubación se le añadió 2 mL del Tampón-1, más la apirasa y se centrifugó a 941 g/8 min/20 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con la cantidad adecuada de Tampón-2/sin albúmina.

Tras 30 minutos (para permitir que se produzca la desesterificación de la sonda por las esterasas intracelulares), y 10 minutos antes de empezar el experimento se le adicionó Ca^{2+} ($100 \mu\text{M}$)_f.

Durante todo el proceso, las plaquetas cargadas con la sonda se protegen de la luz.

3.3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MEDICIÓN DE ROS

La medida de ROS se realizó en un espectrofluorímetro con 3×10^5 cel/ μl de Tampón-2 a 37 °C y se procedió a la realización de los siguientes experimentos:

a. En respuesta a trombina (0,3 U/mL)_f

Las plaquetas cargadas con la sonda (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 37 °C), se depositaron en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos CaCl_2 (1 mM)_f para conseguir un medio extracelular con Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 1 minuto, añadimos la trombina a una concentración final de 0,3 U/mL y registramos la señal de fluorescencia durante 1 minuto.



b. En respuesta a ADP (5 μM)_f

Las plaquetas cargadas con la sonda (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 37 °C), se depositaron en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos CaCl_2 (1 mM)_f para conseguir un medio extracelular con Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 1 minuto, añadimos ADP a una concentración final de 5 μM y registramos la señal de fluorescencia durante 1 minuto.



c. En respuesta a Hcy (50 y 200 μM)_f

Las plaquetas cargadas con la sonda (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 37 °C), se depositaron en la cubeta de medida, dentro del espectrofluorímetro, a continuación añadimos CaCl_2 (1 mM)_f para conseguir un medio extracelular con Ca^{2+} , registramos la señal de fluorescencia durante 1 minuto, añadimos Hcy a concentraciones finales de 5 y 20 μM y registramos la señal de fluorescencia durante 7 minutos.



d. Calibración

Realizamos dos mediciones: una solo colocando CaCl_2 para verificar que el primer estímulo no produce un incremento de ROS a través del tiempo, y por último para detectar una respuesta máxima añadimos H_2O_2 .

- **Respuesta Basal: CaCl_2 (100 μM)_f**



- **Respuesta máxima: H_2O_2 (1 mM)_f**



e. Sobrenadante

Puesto que la sonda tiende a ser eliminado por la célula con el tiempo, este contribuye a la fluorescencia total medida en cada experimento. Por ello, fue necesario determinar la fluorescencia del sobrenadante y tener en cuenta este valor en los cálculos de ROS intracelular. Las plaquetas cargadas con la sonda (50 μl en 1950 μl de Tampón-2 a 20 °C), fueron depositadas en un tubo de ensayo y centrifugadas a 941 g/8 min/20 °C, recogimos el sobrenadante para medir en el espectrofluorímetro. Le añadimos H_2O_2 (1 mM)_f, se registró 7 minutos.



f. Cálculo de la concentración de ROS

Para calibrar las señales de fluorescencia, se utilizaron unidades arbitrarias.

3.2 ENSAYO 4

3.4.1 MEDICIÓN DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

3.4.1.1 Principio del ensayo

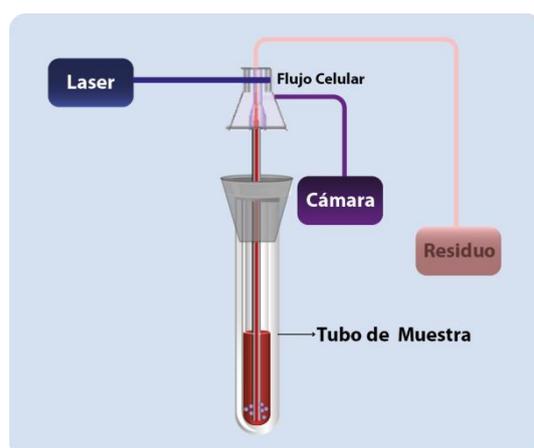


Figura 5: Sistema de flujo de un citómetro
(www.bd.com).

La citometría de flujo es una técnica que analiza y mide las características específicas de un número elevado de células. Antes del análisis citométrico, las células en suspensión son marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente. En el citómetro de flujo, las células suspendidas atraviesan una cámara de flujo, a una velocidad de 1.000 a 10.000 células por minuto, a través de un láser (Givan, 1992). En función de la capacidad del láser se pueden medir múltiples parámetros celulares basados en la foto-dispersión y la fluorescencia y posteriormente llevar a cabo la separación física de sub-poblaciones de células según su tamaño y complejidad. El citómetro de flujo consta de tres sistemas principales:

a) **Sistema de flujo:** Rodea la suspensión celular en flujo, con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra, a velocidad constante y controlada, a través de una zona de detección (cámara de flujo), donde las células o

partículas pasan de forma perpendicular a través de un haz iluminador (laser) (Fig. 5) (Barrientos y cols., 2009; www.bd.com).

b) Elementos ópticos: Compuesto de lentes y prismas (filtros ópticos). Permiten el enfoque del láser, que es una fuente de iluminación monocromática y de intensidad conocida. Los lentes y prismas, al enfocar la iluminación de las partículas o células de la muestra, también detectan la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso (Fig. 6) (Barrientos y cols., 2009; www.bd.com).

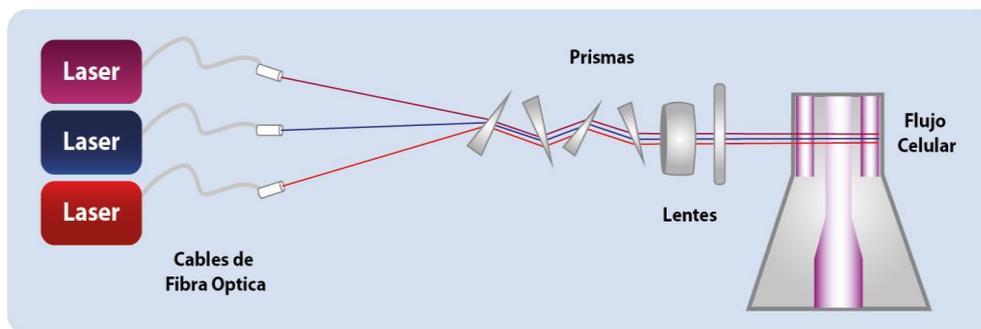


Figura 6: Elementos ópticos de un citómetro (www.bd.com).

c) Sistema de tratamiento de señales: Proporciona una iluminación de intensidad constante, que detectada y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular. El sistema operativo, permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis a tiempo real y en modo de lista de datos, estos datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o biparamétricos o en forma de plots o puntos (donde cada punto representaría una célula), de la distribución (Fig. 7) (Barrientos y cols., 2009; www.bd.com).

Como ya mencionamos, las células pasan a través del flujo rodeadas por un fluido envolvente en dirección perpendicular al haz del láser. Cuando solo pasa fluido, no se produce dispersión alguna de luz. Pero al pasar una célula frente al láser, ésta dispersa la luz, lo que se detecta mediante unos tubos fotomultiplicadores. La dispersión tiene dos componentes: **dispersión frontal** (FSC: del inglés *forward scatter*, detecta el tamaño celular) y **dispersión lateral** (SSC: del inglés *side scatter*, detecta la complejidad o granularidad celular) al eje del láser. Además, cuando las células han sido marcadas con un fluorocromo (Ej: Ficoeritrina y/o Fluoresceína), para detectar una molécula celular (Ej: CD62 y/o CD61), la luz fluorescente que emite, se dispersa también lateralmente y detecta las intensidades relativas de emisión de fluorescencia (Fig. 8).

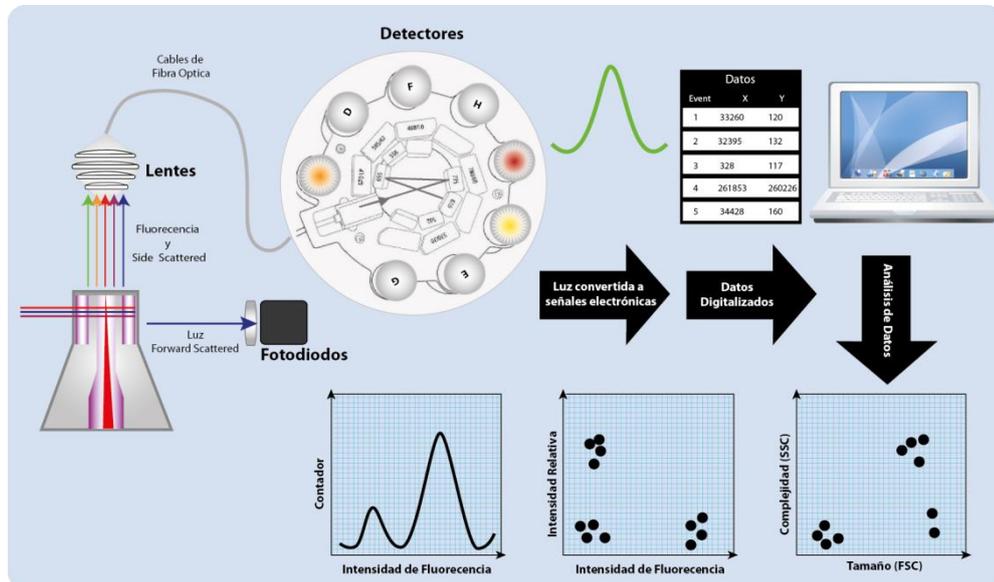


Figura 7: Sistema de tratamiento de Señales. Una vez que la muestra pasa por los láseres, estos dispersan la luz, por dispersión frontal (DF) (forward scatter) y lateral (DL) (side scatter), la luz es recogida por el sistema óptico (lentes) y la señal pasa por los detectores, para finalmente pasar por un sistema de tratamiento de señales (Carlson y cols., 1997; www.bd.com).

Por lo tanto, la citometría permite el análisis, para cada célula, de dos parámetros de dispersión (SSC/FSC) y como mínimo tres fluorescencias (en equipos con un solo láser), FL1, FL2, FL3. Para poder separar la dispersión de las diferentes fluorescencias se utiliza un sistema de filtros ópticos y todas las señales son convertidas a valores digitales (Fig. 7). Estos valores no son absolutos sino relativos ya que indican que en una población determinada existen células que presentan diferentes niveles de fluorescencia o de dispersión de luz. Si se elaboran histogramas de frecuencia con estos datos se puede apreciar la distribución de la población que ha sido analizada de acuerdo a cualquiera de los parámetros medidos (Fig. 8) (Carlson y cols., 1997; www.bd.com).

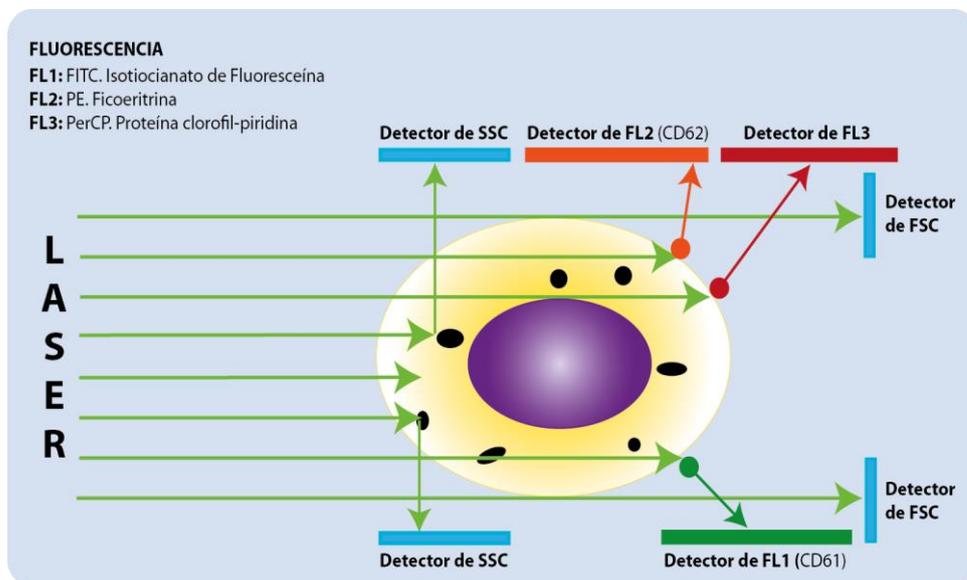


Figura 8: Detección de señales de fluorescencia. El citómetro de flujo permite detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula. Una vez que la muestra pasa por los láseres, estos dispersan la luz, por dispersión frontal (FSC: forward scatter) y lateral (SSC: side scatter). Por dispersión lateral también son recogidas las señales de fluorescencia de las moléculas de interés, en este caso el CD61 marcado con FITC para la detección de las plaquetas y el CD62P marcado con PE, para la detección de plaquetas activadas (Carlson y cols., 1997; www.bd.com).

3.4.2 PROTOCOLO

3.4.2.1 Determinación de la activación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (PRP), a través de la expresión de la P-selectina

Para el análisis citométrico, determinamos la expresión de la P-selectina o CD62P a partir de PRP, obtenido con el mismo procedimiento que se utilizó para la agregación.

- a. Una vez obtenido el PRP se ajustó el número de plaquetas a 3×10^5 cel/ μ l con PBS-0,3 % albúmina.
- b. Incubamos 200 μ l de las células con 10 μ l de EDTA (2 mM)_f y 20 μ l de los reactivos: Hcy, DC, CDC durante 10 min/37 °C y con BSO, TNF, IL-6 durante 1 hora/37 °C (Tabla 3).
- c. Añadimos 20 μ l de ADP (5 μ M)_f y con agitación (194 g ó 1000 rpm) incubamos por 3 min/37 °C.



- d. Inmediatamente recolectamos 15 μ l de la muestra y la colocamos en 30 μ l de PBS 0,16 % PA. Se mezcló bien.
- e. Se incubó 15 min/20 °C. Luego se añadió 1 mL de PBS 0,3 % albúmina y se centrifugó a 941 g/10 min.
- f. Se eliminó sobrenadante y se resuspendieron las plaquetas con 30 μ l de PBS.
- g. Se tomaron 10 μ l de la resuspensión y se añadió 5 μ l de CD61-FITC (para la detección de población plaquetaria) y 5 μ l CD62P-PE (para la detección de la activación plaquetaria).
- h. Se incubó todo 30 min/4 °C, y se recolectaron 10 μ l de esta muestra en 250 μ l de PBS.
- i. Por último se procedió a la medición de la expresión de los receptores de superficie.
- j. La adquisición fue de 50.000 eventos, en el citómetro FAC-Sort (Becton-Dickinson), y el software utilizado fue el CELLQuest™, que permite el análisis cuantitativo de los datos, así como el análisis logarítmico y combinaciones lógicas de varias regiones analizadas. Asimismo, realiza las compensaciones adecuadas en base a la información obtenida.

Tabla 3: Concentraciones de los agonistas usados para la citometría de flujo.

Reactivos	Concentraciones de trabajo	Concentraciones finales en la muestra
Hcy	2,5 mM	200 μ M
Butionina Sulfoximina(BSO)	62,5 mM	5 mM
Ácido Desoxicólico (DC)	1,25 mM	100 μ M
Ácido Quenodesoxicólico (CDC)	1,25 mM	100 μ M
Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)	20 μ g/mL	1 μ g/mL
Interleiquina-6 (IL-6)	20 μ g/mL	1 μ g/mL

3.5 ENSAYO 5

3.5.1 MEDICIÓN DE HOMOCISTEÍNA (Hcy) TOTAL EN PLASMA

3.5.1.1 Principios del ensayo: INMUNO-ENSAYO COMPETITIVO

Se utilizó el kit IMMLITE/IMMULITE 1000. Requiere un pre-tratamiento preliminar de la muestra. La Hcy presente en el plasma, es liberada de sus proteínas de unión (albúmina en su mayoría) y convertida en S-adenosil-homocisteína (SAH) durante una incubación de 30 minutos a 37 °C en presencia de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y ditionirol (DTT).

La muestra tratada y anticuerpos anti-SAH marcados con fosfatasa alcalina son introducidos simultáneamente en la unidad de reacción que contiene una bola de poliestileno recubierta con SAH. Durante 30 minutos de incubación, la SAH obtenida a partir de la muestra preparada compite con la SAH inmovilizada por la unión al anticuerpo anti-SAH unido a la fosfatasa alcalina. El conjugado enzimático no unido es eliminado mediante un lavado por centrifugación. (<http://www.medical.siemens.com>).

3.5.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.5.2.1 Sobrecarga con L-metionina

- a. La sobrecarga con metionina permitió amplificar la capacidad de detección de la hiperhomocisteinemia, asociada a la deficiencia de las vías de transulfuración (Burjel y cols., 2007). Por lo tanto, a los animales tanto controles como LCB de 21 días, se les administró L-metionina (100 mg/Kg i.p.) (Ebrahimkhani y cols., 2005), y la sangre fue recolectada sobre hielo 2 horas más tarde, con EDTA-K₃ (15 %) en una relación de 57 µl/5 mL de sangre.
- b. Para la obtención del plasma: la sangre se centrifugó a 1938 g/10 min/4 °C.
- c. Se hicieron alícuotas de 1 mL y se guardó a -80 °C.
- d. Las muestras fueron analizadas en la Facultad de Veterinaria en el Dpto. de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia.



4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm un error estándar, para valorar las diferencias estadísticas entre un mismo grupo. Para las comparaciones entre los grupos se utilizó el análisis de la varianza, seguido de *t* de Student, cuando era necesario, considerándose estadísticamente significativo un valor del nivel de significación $p < 0,05$. Las respuestas de área bajo la curva fueron calculadas segundo a segundo en cada respuesta individual como el integral del aumento de calcio por encima de la basal, durante 180 segundos.



V

RESULTADOS



1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los animales con la ligadura del conducto biliar (LCB), presentaron los signos característicos de la cirrosis, es decir, presencia de pigmentación amarilla a nivel cutáneo y orina, hepatomegalia, esplenomegalia, dilatación vascular generalizada y ascitis en una cantidad variable.

A medida que avanza la enfermedad, las ratas LCB presentan incremento en el tamaño del bazo, tanto en ratas tratadas como en las sin tratar con ácido fólico, dándonos una diferencia significativa con respecto a su control ($p < 0,05$) (Tabla 1). En cuanto al peso corporal, hay una disminución en las LCB de 15 y 21 días, sin tratamiento, aunque aumentan más tarde, debido a la presencia de ascitis. Los animales tratados con ácido fólico, disminuyen de peso de forma significativa a los 15 días de haberles realizado la ligadura. Comparando el peso corporal entre tratadas vs sin tratar, no encontramos diferencias significativas.

Tabla 1: Valores del peso corporal y del bazo, en animales control, LCB de 15, 21 días y con ascitis. Sin y con tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl; (♦): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

	Ctrl Sin/tto (n=96)	LCB(15d) Sin/tto (n=8)	LCB(21d) Sin/tto (n=70)	LCB(Asc) Sin/tto (n=64)	Ctrl Con/tto (n=43)	LCB(15d) Con/tto (n=13)	LCB(21d) Con/tto (n=31)	LCB(Asc) Con/tto (n=30)
Peso Corporal (g)	321,9±5,2	273,5±5,3*	299,4±5,5*	328,4±6,6	305,8±8,1	262,5±4,5♦	284,4±9,7	330,5±8,6
Bazo (g)	0,8±0,02	1,7±0,1*	2,2±0,1*	2,5±0,1*	0,8±0,2	1,7±0,1*	2,2±0,1*	2,55±0,1*

2. ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA CIRROSIS HEPÁTICA BILIAR

2.1 MEDICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Para la medición de la agregación en plasma rico en plaquetas (PRP), se tomaron en cuenta dos parámetros: el **área bajo la curva** (Fig. 1A) y la **agregación máxima** (Fig. 2A). En el primero, vemos que las plaquetas de los animales con LCB compensada, tras ser estimuladas con ADP (5 μ M), presentaron un incremento de la respuesta a los 15 y 21 días respecto al grupo control, ($p < 0,05$). En LCB con ascitis, el área de agregación disminuye con respecto al grupo control, ($p < 0,05$) (Fig. 1, Tabla 2). Es decir, una vez que hay una cirrosis descompensada, con aparición de ascitis, la agregación se ve disminuida (76,5 %) con respecto al control.

En cuanto al segundo parámetro, el porcentaje de **agregación máxima**, el mayor valor se encontró en las LCB de 15 y 21 días, con respecto a su control, siendo ambos estadísticamente significativos, ($p < 0,05$). En el grupo de LCB con ascitis no hubo diferencias significativas con respecto al control (Fig. 2, Tabla 2).

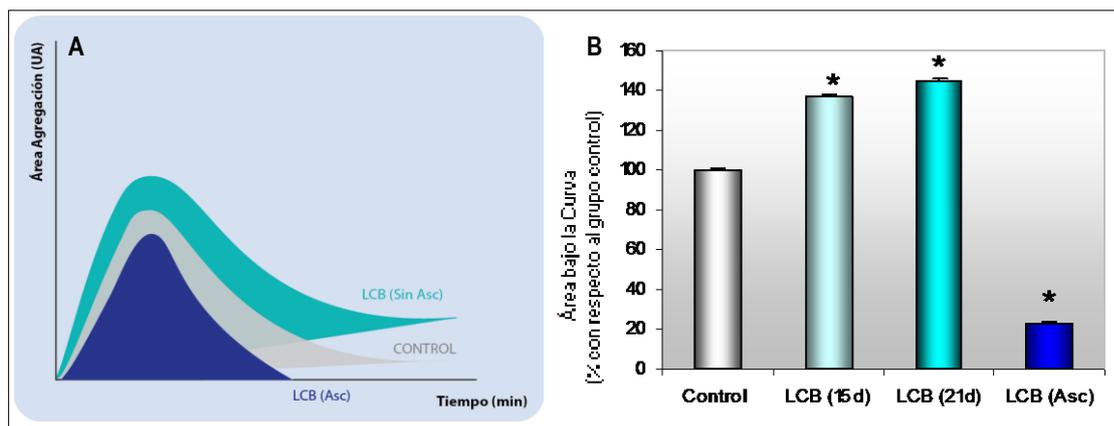


Figura 1: (A) Representación gráfica de la agregación plaquetaria expresada en **área bajo la curva** en respuesta al ADP (5 μ M). (B) Agregación plaquetaria expresada en **área bajo la curva** en respuesta al ADP (5 μ M) en animales control (Ctrl) y con ligadura del conducto biliar (LCB) de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

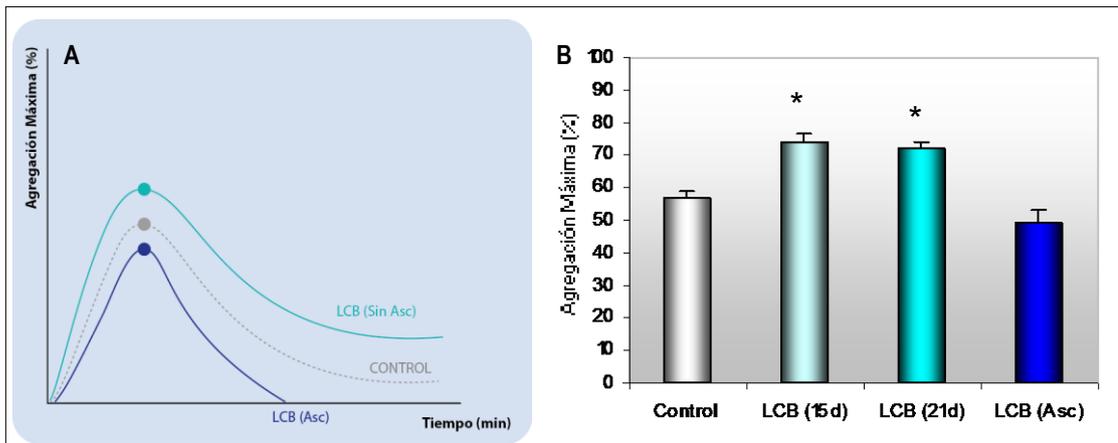


Figura 2: (A) Representación gráfica de la agregación plaquetaria expresada en **agregación máxima (%)**. (B) Agregación máxima (%) en respuesta al ADP (5 μ M) en animales control (Ctrl) y con ligadura del conducto biliar (LCB) de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Tabla 2: Agregación plaquetaria en respuesta a ADP (5 μ M), expresada en %, en el área y agregación máxima, en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

	Ctrl Sin/tto (n=6)	LCB (15d) Sin/tto (n=6)	LCB (21d) Sin/tto (n=7)	LCB (Asc) Sin/tto (n=6)
Área de agregación	100 \pm 0,9	136 \pm 1,4 *	145 \pm 0,8 *	23,4 \pm 10,4 *
Agregación máxima	57,2 \pm 2	73,9 \pm 2 *	72,2 \pm 1,5 *	49,3 \pm 3,6

2.2 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA P-selectina

2.2.1 RESPUESTA BASAL

Basalmente, es decir sin activación con ADP, vemos que hay una mayor expresión del receptor para la P-selectina, en LCB de 21 días y en LCB con ascitis, siendo estadísticamente significativo con respecto a su control, ($p < 0,05$) (Tabla 3).

2.2.2 RESPUESTA A ADP (5 μ M)

Tras la activación con ADP (5 μ M), la expresión de P-selectina se ve significativamente aumentada en ratas LCB de 21 días con respecto a su control, ($p < 0,05$). Sin embargo, las ratas LCB con ascitis presentan una expresión similar al control (Fig. 3, Tabla 3).

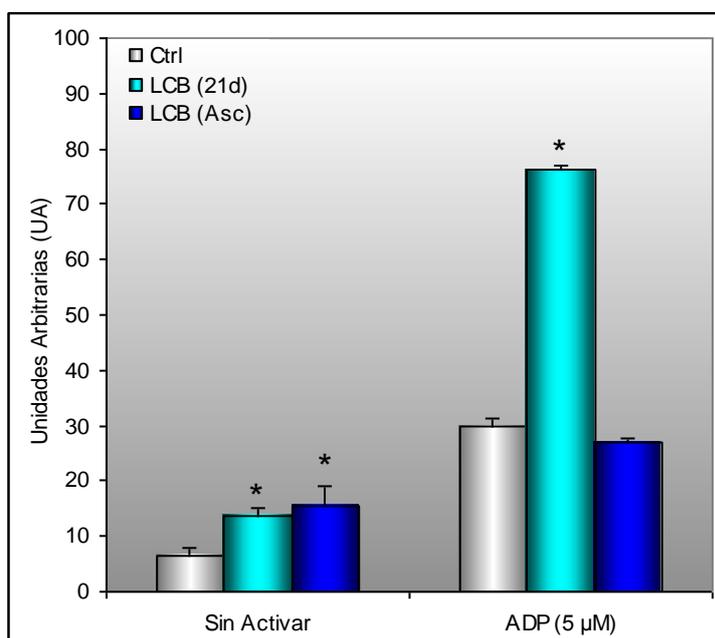


Figura 3: Representación de la expresión de la P-selectina. Respuesta basal (sin activación) y tras la activación con ADP (5 μM) (con 1 hr de incubación con salino) en animales control, LCB de 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs mismo Ctrl.

Tabla 3: Valores de expresión de P-selectina, en unidades arbitrarias (UA), en animales control y con ligadura del conducto biliar de 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

	Ctrl Sin/tto (n=6)	LCB (21d) Sin/tto (n=6)	LCB (Asc) Sin/tto (n=8)
Sin Activar	6,6±1,2	13,7±1,3 *	15,4±3,5 *
ADP (5 μM) 10 min	29,8±1,6	65,8±0,6 *	26,5±1,3
ADP (5 μM) 1 hr	29,8±1,6	76,4±0,7 *	26,9±0,6

3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INTRÍNSECAS

3.1 MEDICIÓN DEL Ca^{2+} INTRACELULAR

3.1.1 NIVELES BASALES DE Ca^{2+} INTRACELULAR

La figura 4 nos muestra la representación de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular de los grupos con cirrosis biliar y control. Como vemos, son significativamente más altos en ratas LCB de 21 días y ascitis vs control.

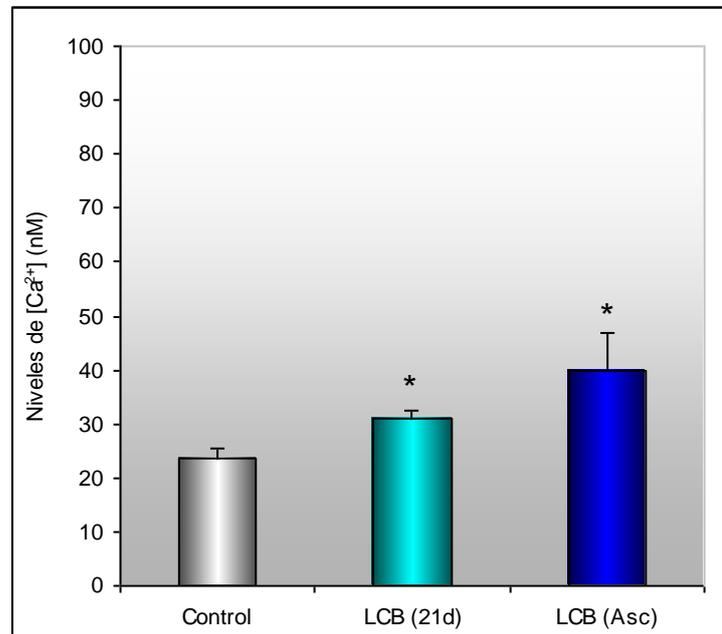


Figura 4: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

3.1.2 LIBERACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR:

En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 μM)

La respuesta al agonista Tr en ausencia de Ca^{2+} extracelular (EGTA 200 μM) da lugar a un aumento intracelular de Ca^{2+} , debido a la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, encontrándose un aumento mayor en ratas LCB 21 días con respecto al control ($p < 0,05$). Sin embargo, con ADP no encontramos diferencias significativas con ninguno de los grupos de estudio (Fig. 5, Tabla 4).

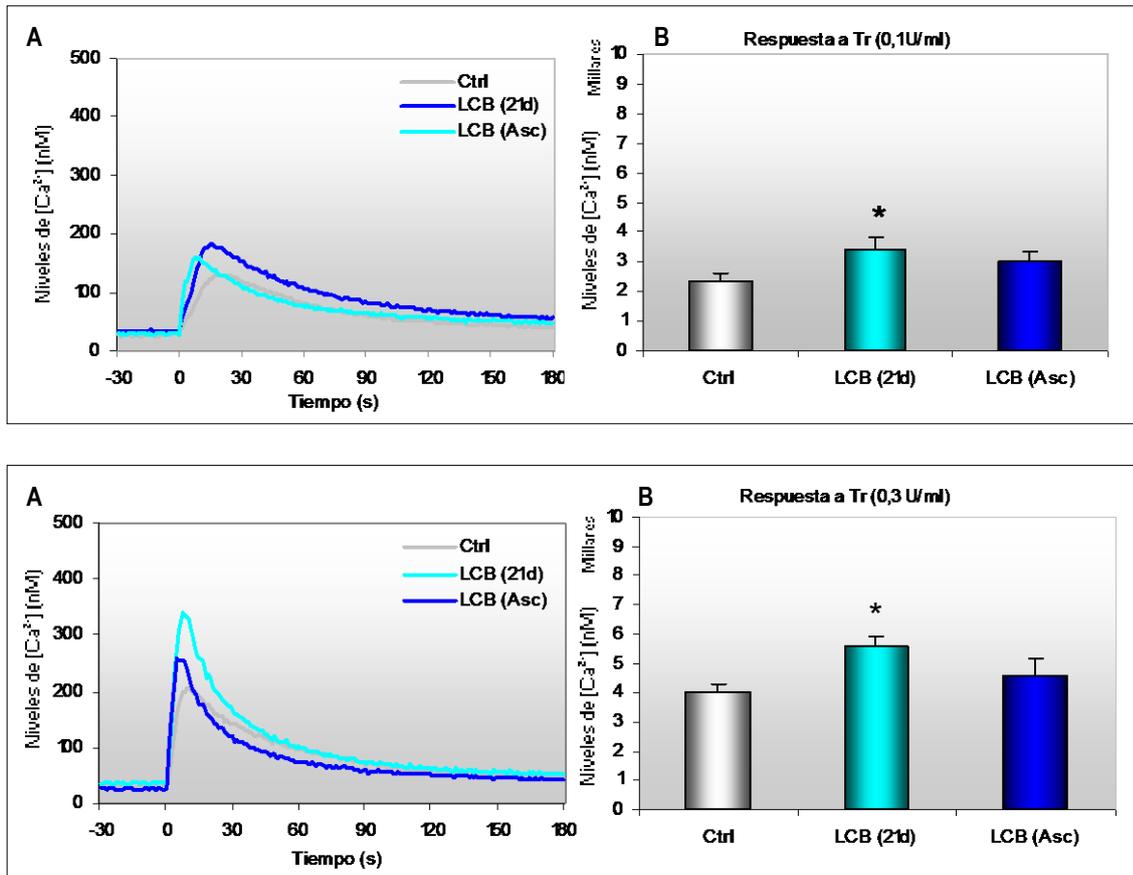


Figura 5: (A) Cambios del Ca²⁺ intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/mL), en ausencia de Ca²⁺ (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis. (*): p<0,05 vs ctrl.

Tabla 4: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca²⁺ intracelular en respuesta a Tr y ADP en plaquetas de animales control, LCB 21 días y con ascitis. (*): p<0,05 vs Ctrl

Agonistas	Ctrl	LCB(21d)	LCB(Asc)
Tr (0,1 U/mL)	2366,1±229,1 (n=10)	3710,3±310,2 * (n=18)	3035,2±813,6 (n=5)
Tr (0,3 U/mL)	3988,3±309,1 (n=8)	5755,1±289,4 * (n=9)	4542,5±655,6 (n=6)
ADP (5 μM)	2073,2±99,1 (n=14)	2102,9±61,2 (n=20)	2333,3±315 (n=6)

3.1.3 ENTRADA DE Ca^{2+} EXTRACELULAR:

En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 μM)

Al ser estimuladas con los agonistas, en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM), observamos un aumento de Ca^{2+} intracelular, que corresponde tanto a la salida de éste desde los depósitos intracelulares como a la entrada desde el espacio extracelular. Existen diferencias significativas de este incremento entre animales control vs LCB de 21 días y ascitis en respuesta a Tr (0,1 U/mL), mientras que en respuesta a ADP (5 μM) solo hay diferencias en ratas LCB de 21 días vs control (Fig. 6, Tabla 5).

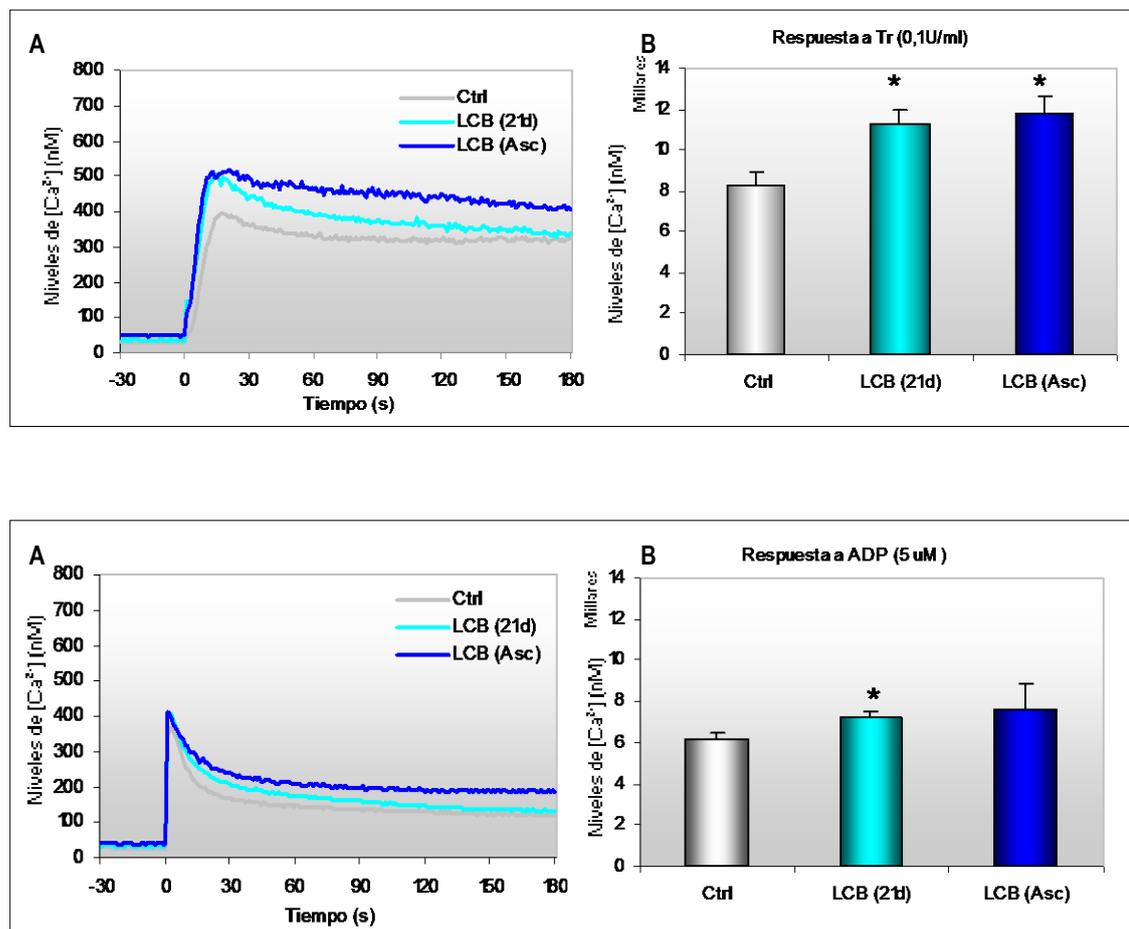


Figura 6: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 U/mL) y ADP (5 μM), en presencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0.05$ vs Ctrl.

Tabla 5: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca²⁺ intracelular en respuesta a la trombina y ADP en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis (*): p<0,05 vs Ctrl.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Tr (0,1 U/mL)	8227,4 ±721,6 (n=11)	10658,7±348,4 * (n=11)	10607,1±74 * (n=6)
Tr (0,3 U/mL)	78366,4 ±3770,7 (n=7)	84107,6 ±4262,5 (n=12)	98268,5 ±9620,7 (n=6)
ADP (5 μM)	6347,7 ±276,4 (n=14)	7305,8 ±253,2 * (n=20)	7661,1 ±1209,9 (n=6)

3.1.4 NIVELES TOTALES DE Ca²⁺ PLAQUETARIO:

En respuesta a TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca²⁺ intracelular almacenados en las diversas estructuras intra-plaquetarias, se eliminó todo el Ca²⁺ extracelular presente (EGTA 200 μM) y se estimuló su salida desde los almacenes con TG e ionomicina. El Ca²⁺ liberado por el grupo LCB de 21 días fue mayor que en el grupo control (p<0,05) (Fig. 7 y Tabla 6).

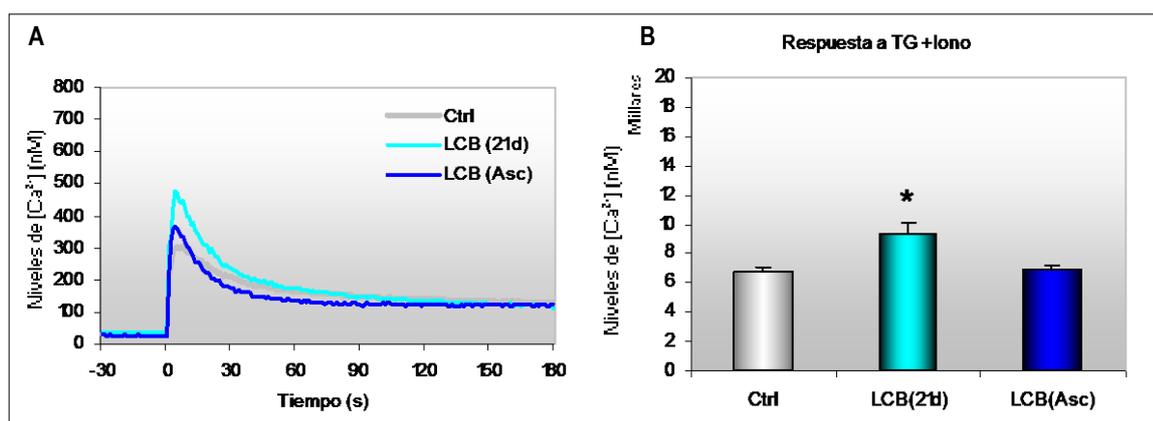


Figura 7: (A) Cambios del Ca²⁺ intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca²⁺ (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis. (*): p<0,05 vs Ctrl.



Tabla 6: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca^{2+} intracelular en respuesta a TG + Ionomicina en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Agonista	Ctrl (n=11)	LCB (21d) (n=11)	LCB (Asc) (n=5)
TG+Iono	6752,8±359,4	8698,5±807,2 *	6860,4±370,9

3.1.5 ENTRADA CAPACITATIVA DEL Ca^{2+} (ECC)

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} con TG o únicamente de los sensibles a TBHQ, da lugar a un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracitoplasmáticos, siendo mayor el efecto en plaquetas de ratas LCB de 21 días que en las de los controles. La aparición de ascitis revierte este efecto. Posteriormente, al adicionar Ca^{2+} al medio extracelular se produce un gran aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la ECC. La ECC está disminuida en las plaquetas de las ratas cirróticas y la aparición de ascitis altera aún más este proceso (Fig. 8 y 9, Tabla 7).

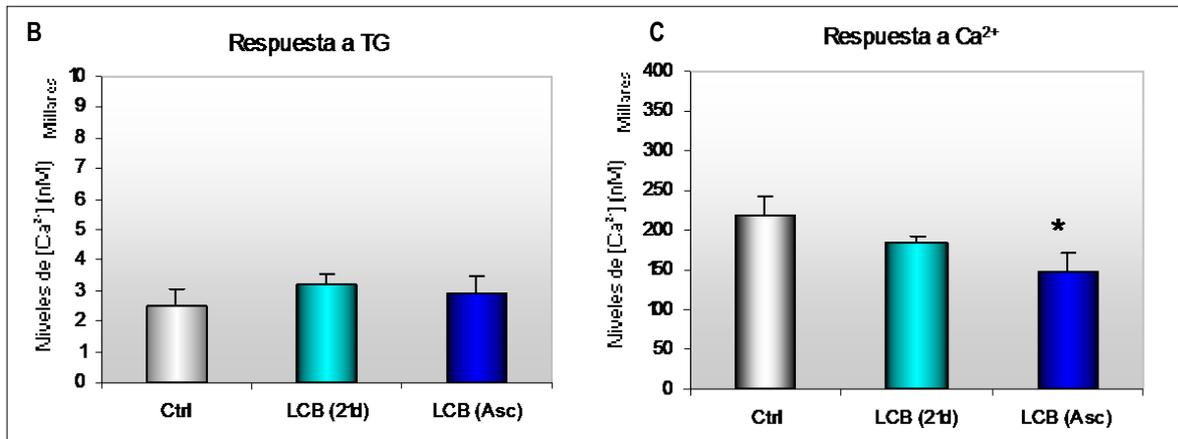
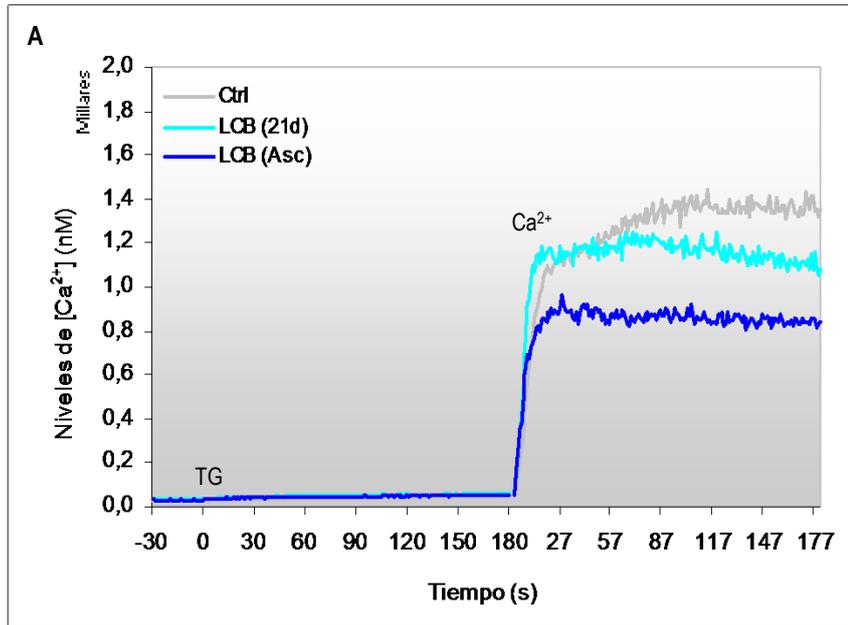


Figura 8: (A) Efecto de la TG sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) Área bajo la curva en respuesta a la TG, (C) Área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

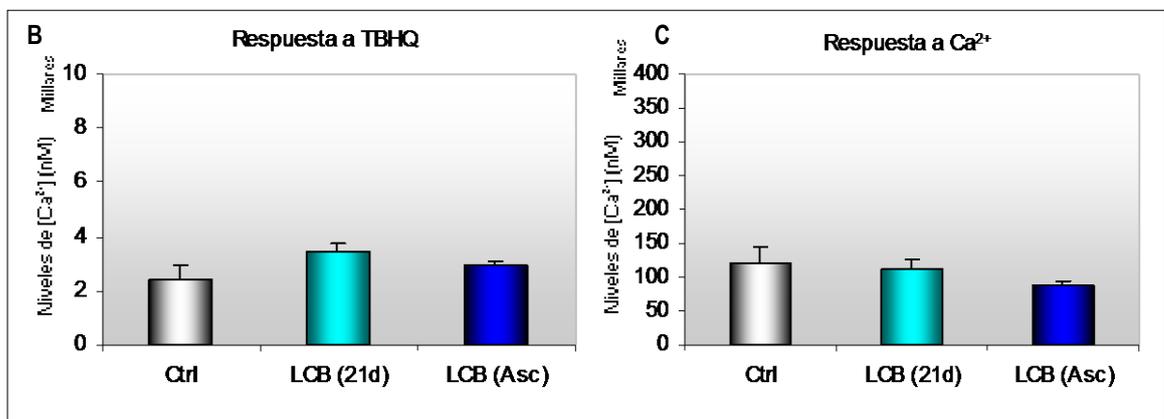
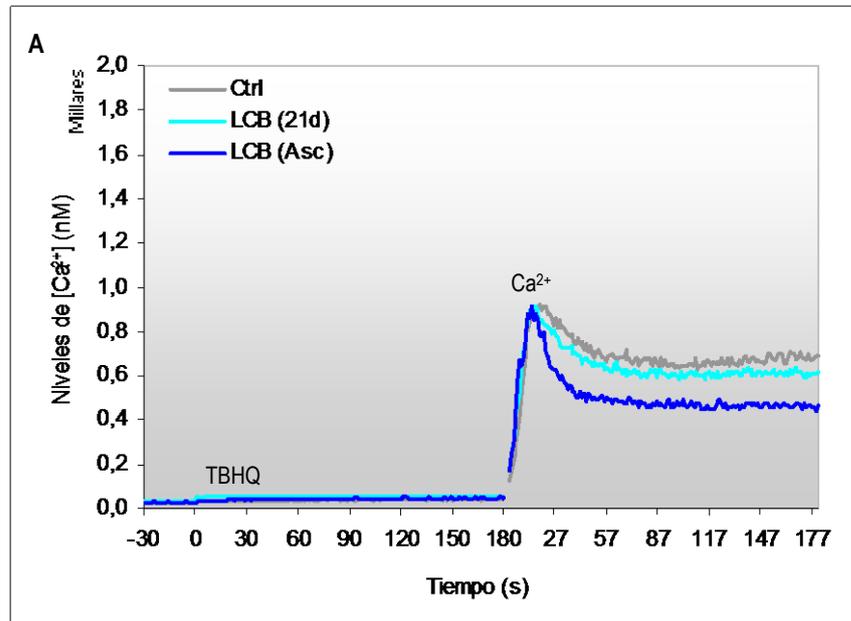


Figura 9: (A) Efecto del TBHQ sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) Área bajo la curva en respuesta a TBHQ, (C) Área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} , en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis.

Tabla 7: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) entrada capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la TG y TBHQ y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en animales control y LCB de 21 días y con Ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
TG	2533,3±507,3	3222,1±317	2928,2±568,4
Ca^{2+}	218794,2±22056,8 (n=9)	183770,1±8614,5 (n=13)	146814,5±24604 * (n=5)
TBHQ	2413,8±541,1	3461,5±323,5	2910,5±197,3
Ca^{2+}	120907,4±23338,6 (n=5)	111895 ±14439,8 (n=7)	88530,7±4879,4 (n=6)

3.1.6 ECC CON REGISTRO DE UNA TERCERA LONGITUD DE ONDA (360 nm)

Cuando estimulamos la ECC con TG y posteriormente administramos MnCl_2 , se produce una entrada del Mn^{2+} a través de los mismos canales de Ca^{2+} responsables de la ECC. Este Mn^{2+} se une al fura-2 intracelular y produce un apagamiento de su fluorescencia, que medimos en el punto isobéptico (360 nm). A 360 nm, los cambios de fluorescencia son independientes de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y nos dan una estimación de la apertura de los canales responsables de la ECC. En la figura 10 vemos que el descenso de la fluorescencia a 360 nm, debido a la entrada capacitativa de Mn^{2+} es menor en las plaquetas de los animales cirróticos.

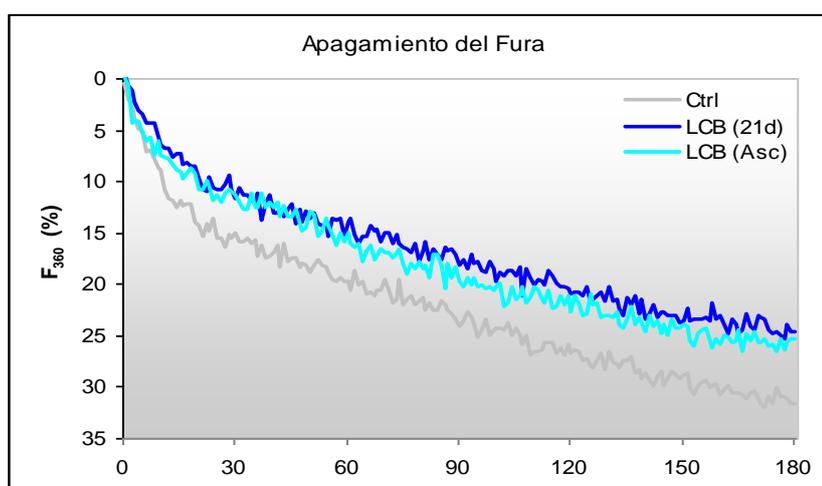


Figura 10: Representación de los cambios porcentuales de la fluorescencia a 360 nm tras la administración de MnCl_2 (100 μM) en plaquetas de animales control, LCB 21 días y ascitis.

3.1.7 PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

3.1.7.1 Respuesta a L-NAME crónico (1 mg/Kg/día)

a. Niveles Basales de Ca²⁺ intracelular

Las plaquetas de animales LCB de 21 días, tratados crónicamente con L-NAME (1 mg/Kg/día), también presentan niveles basales de Ca²⁺ significativamente más altos que sus controles (Fig.11, Tabla 8).

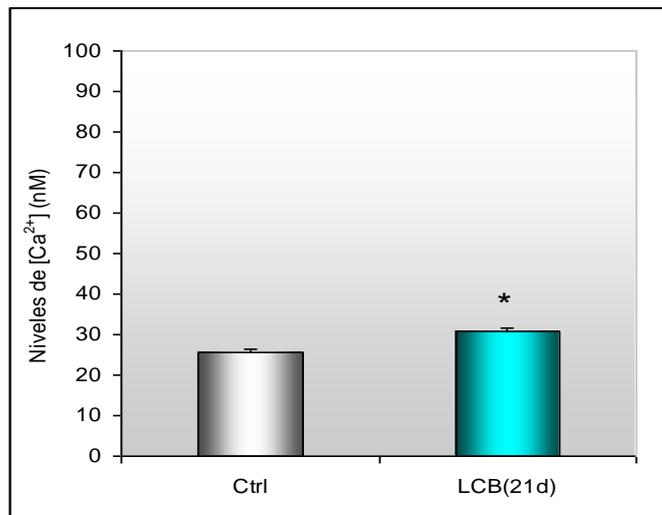


Figura 11: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca²⁺ intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME. (*): p<0,05 vs Ctrl.

Tabla 8: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca²⁺ en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis. (*): p<0,05 vs Ctrl.

	Ctrl (n=10)	LCB (21d) (n=10)
Ca²⁺ Basal	25,5±0,8	30,7±0,7 *

b. Liberación de Ca²⁺ intracelular: En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL)

Al ser estimuladas con la trombina en ausencia de Ca²⁺ extracelular (EGTA 200 μM), se produce un aumento intracelular de Ca²⁺, debido a la salida de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. Siendo también significativamente mayor en ratas LCB 21 días con respecto al control (Fig. 12, Tabla 9).

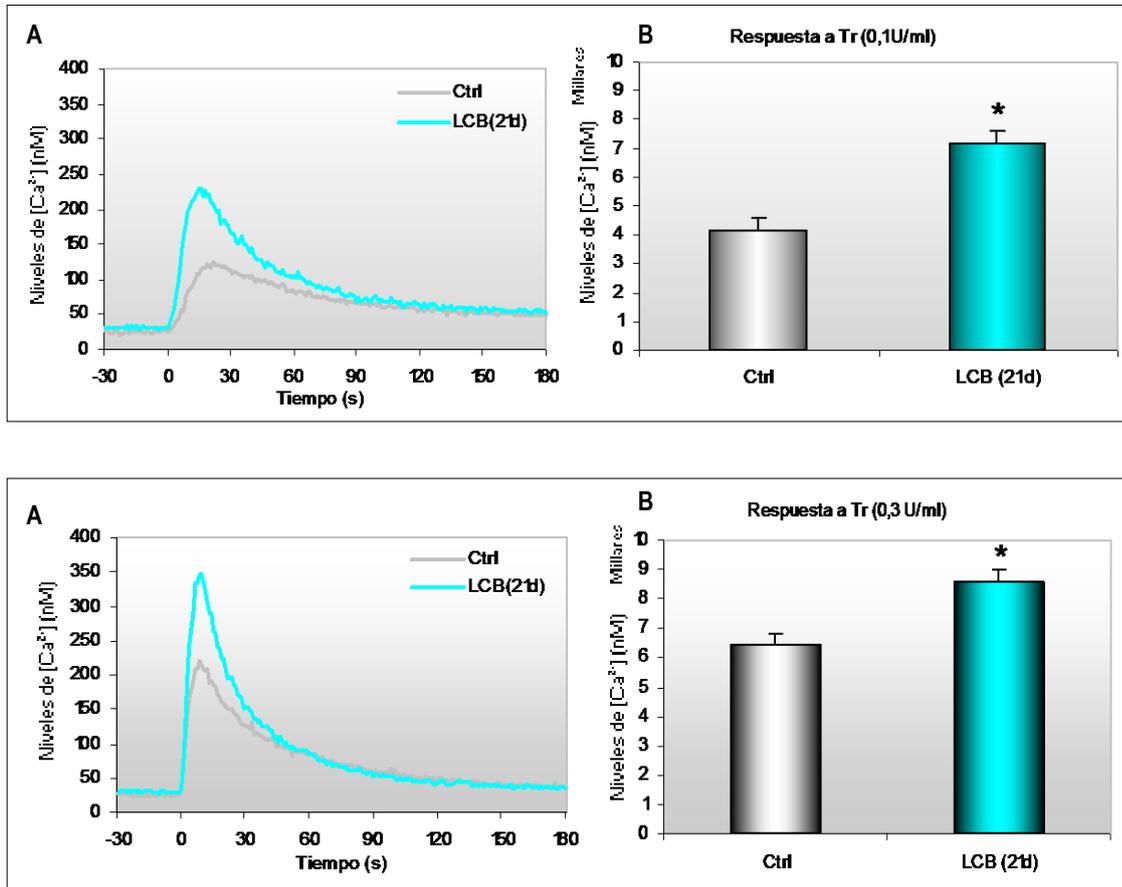


Figura 12: (A) Cambios del Ca²⁺ intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/mL), en ausencia de Ca²⁺, (30 s de registro), en animales control y LCB de 21, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME. (*): p<0,05 vs Ctrl.

Tabla 9: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca²⁺ intracelular en respuesta a la trombina en plaquetas de animales control y LCB 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME. (*): p<0,05 vs Ctrl.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)
Tr (0,1 U/mL)	4151,5±399,3 (n=5)	7159,16±431,1 * (n=5)
Tr (0,3 U/mL)	6430,5±219,7 (n=5)	8557,8±283,3 * (n=5)

c. Entrada de Ca^{2+} extracelular: En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL)

Al ser estimuladas con los agonistas, en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM), observamos que hay un aumento de Ca^{2+} , desde la basal, que corresponde tanto a la salida de este, desde los depósitos intracelulares, como a la entrada desde el espacio extracelular. En este caso, no encontramos diferencias significativas entre controles y LCB de 21, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME (Fig. 13, Tabla C-Anexos.)

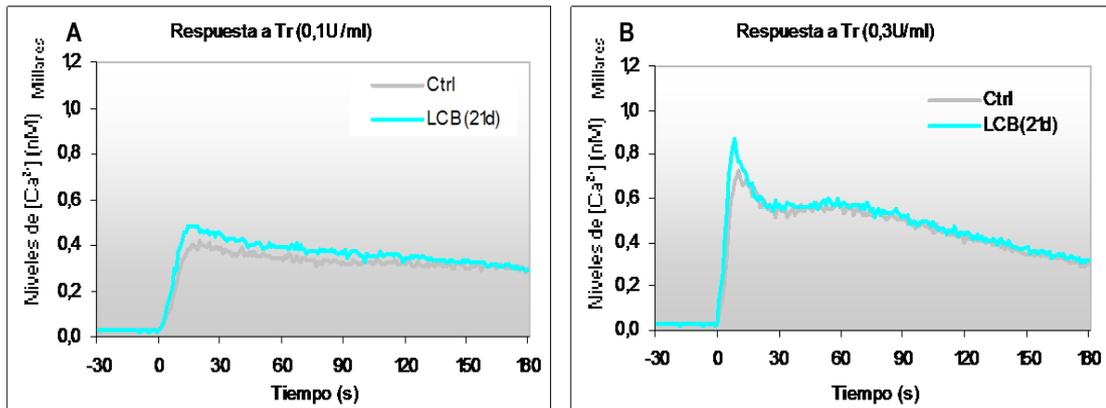


Figura 13: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a la Tr (0,1 y 0,3 U/mL), en la entrada de Ca^{2+} extracelular, (30 s de registro), en animales control y LCB de 21, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME.

d. Niveles totales de Ca^{2+} Plaquetario: En respuesta a TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca^{2+} intracelular almacenados en las diversas estructuras intraplaquetarias, se eliminó todo el Ca^{2+} extracelular presente (EGTA 200 μ M) y se estimuló su salida con TG más ionomicina. Como se aprecia, hay también diferencias significativas de este incremento entre animales control y LCB de 21 días tras el tratamiento crónico con L-NAME (Fig. 14, Tabla 10).

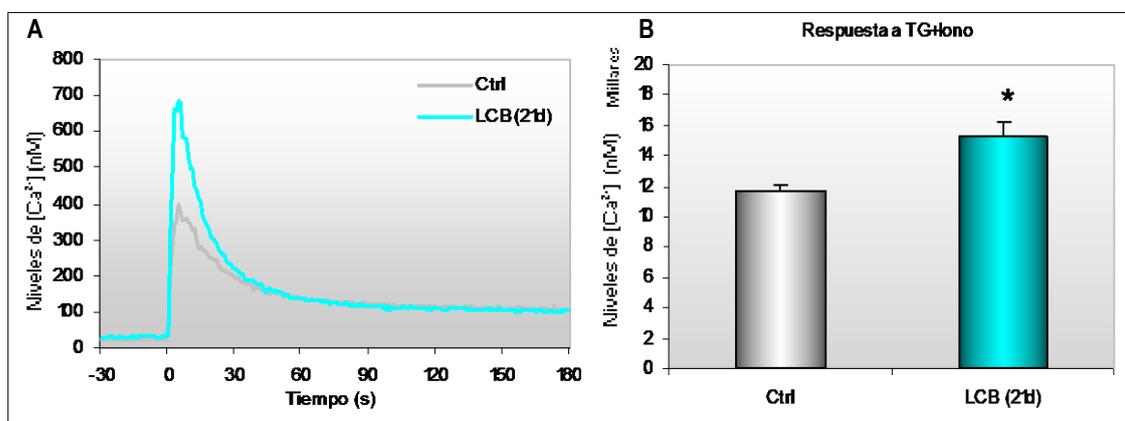


Figura 14: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca^{2+} (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis, tras ser tratadas crónicamente con L-NAME.

Tabla 10: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca^{2+} en respuesta a TG + Ionomicina, en animales control y LCB 21 días. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Agonista	Ctrl (n=5)	LCB(21d) (n=5)
TG + Iono	11673,7±449,1	15265,7±925,4 *

e. Entrada Capacitativa del Ca^{2+} (ECC)

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la estimulación con TG y/o TBHQ da lugar a un aumento de Ca^{2+} intracelular, que es mayor en plaquetas de ratas LCB (Fig. 15A, Tabla 11). Posteriormente, al adicionar Ca^{2+} al medio extracelular, se produce un gran aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la ECC. Este aumento de Ca^{2+} es mayor en controles que en animales cirróticos encontrándose diferencias significativas en LCB de 21 días, tratada crónicamente con L-NAME, pero solo en el protocolo de la TG (Fig. 15B y C, Tabla 11).

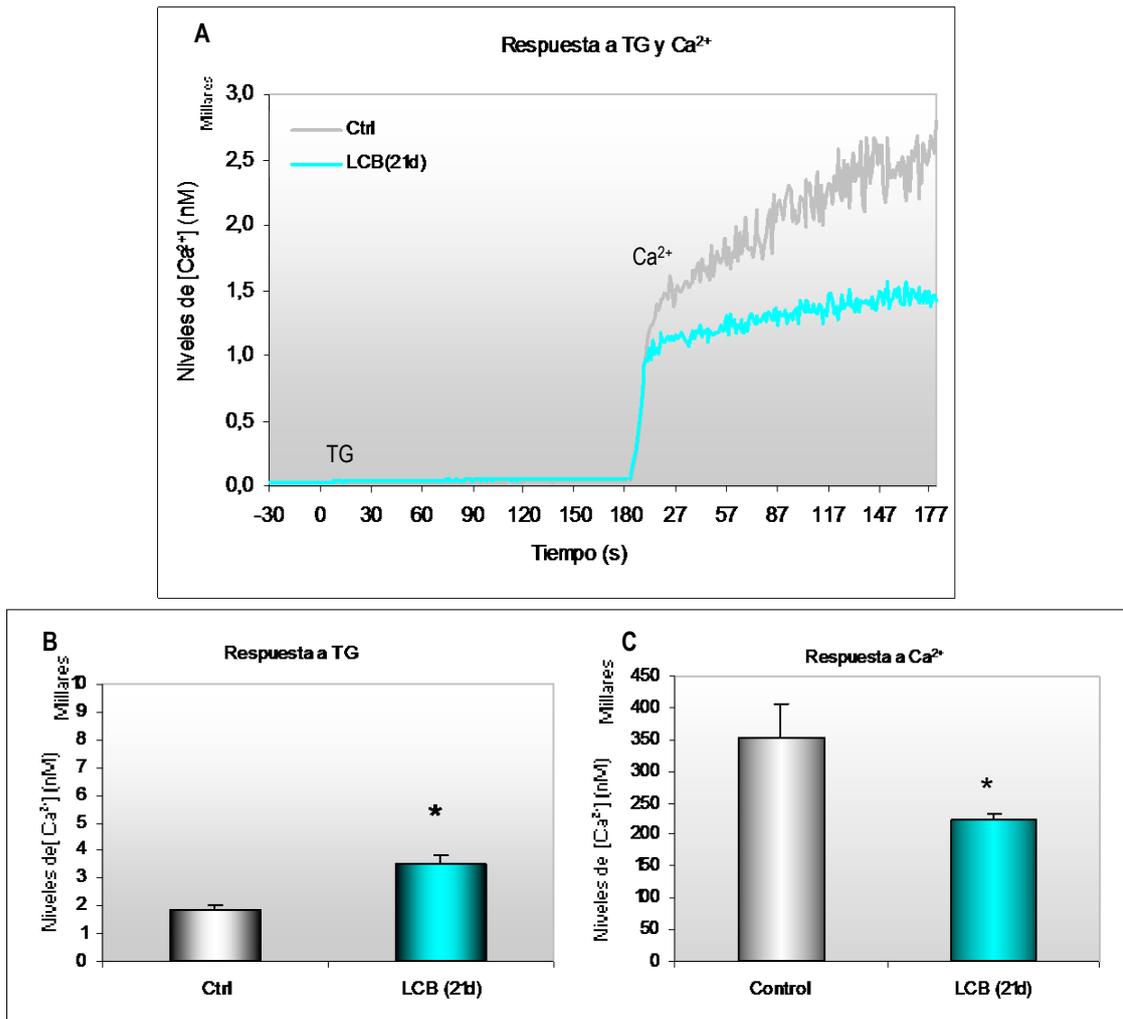


Figura 15: (A) Efecto de la TG sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular, y tras la adición de Ca^{2+} , (B) Área bajo la curva en respuesta a la TG, (C) Área bajo la curva en respuesta al adicionar Ca^{2+} en plaquetas de animales control y LCB de 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Tabla 11: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la TG y TBHQ y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en ratas control y LCB de 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)
TG	1860,6±172,6	3491,7±296,7 *
Ca^{2+}	351853,7±351853,7 (n=5)	222661,2±9731,5 * (n=5)
TBHQ	1549,4±104	2602,8±274,3 *
Ca^{2+}	94985,6±3358,5 (n=5)	89604,3±4292,5 (n=7)

3.1.7.2 Disminución de la disponibilidad de NO con BSO

a. Niveles Basales de Ca^{2+} intracelular

Los niveles basales de Ca^{2+} de las plaquetas, de animales control y LCB, tratados de forma aguda con BSO, presentaron diferencias significativas solo en animales LCB (21d) tratadas vs sin tratamiento con BSO (Fig. 16, Tabla 12).

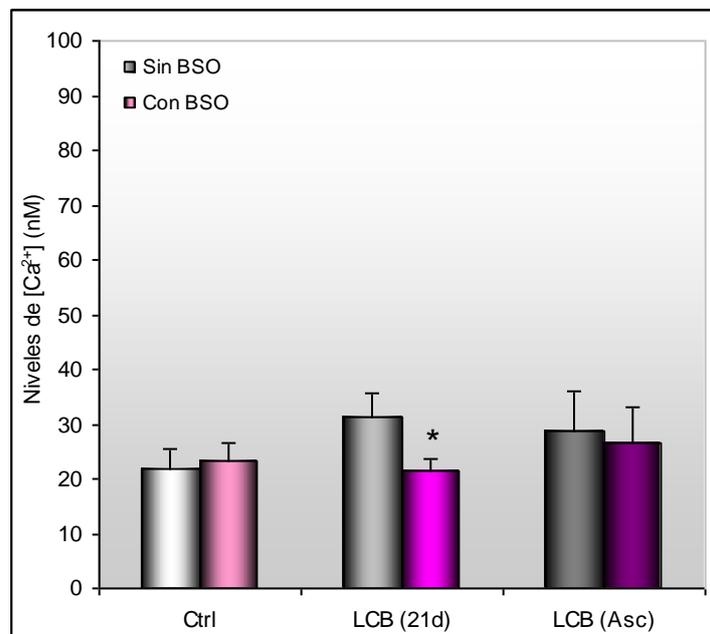


Figura 16: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), en animales control y LCB de 21 días y ascitis, tras ser tratadas agudamente con BSO. (*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin BSO.

Tabla 12: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca^{2+} en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis tratadas agudamente con BSO (5 mM). (*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin BSO.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin BSO	21,6±3,9 (n=5)	31,4±4,2 (n=8)	28,6±7,5 (n=5)
Con BSO	23,2±3,5 (n=5)	21,5±2 * (n=7)	26,5±6,5 (n=6)

b. Liberación de Ca^{2+} intracelular: En respuesta a Tr (0,3 U/mL)

Al ser estimuladas con la trombina en ausencia de Ca^{2+} extracelular (EGTA 200 μM), se observa un aumento intracelular de Ca^{2+} , debido a la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. Existen diferencias significativas en los animales del grupo control sin tratamiento con BSO vs control tratadas con BSO (Fig. 17, Tabla 13).

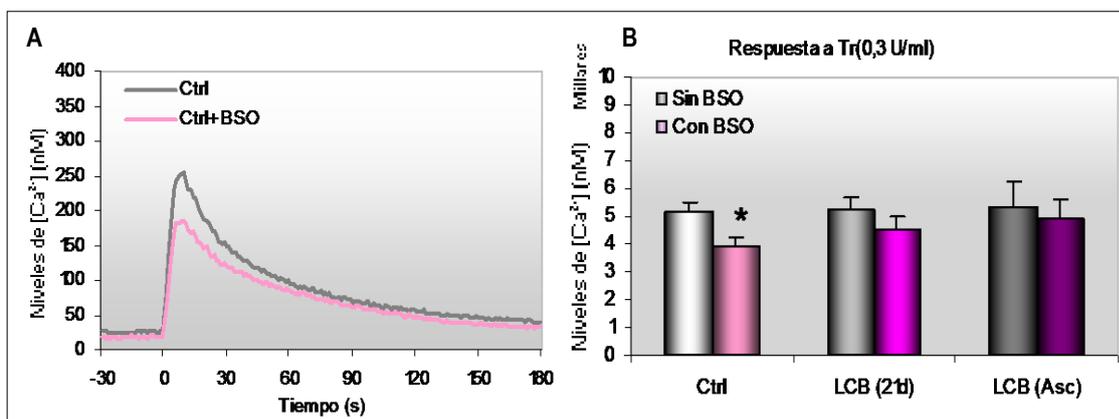
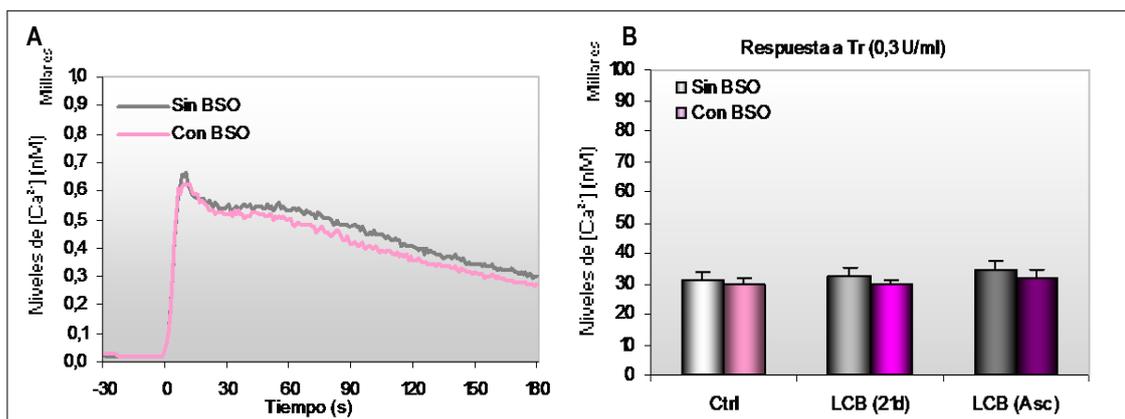


Tabla 13: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la Tr (0,3 U/mL) en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con ascitis, tratadas agudamente con BSO.
(*): $p < 0,05$ vs Ctrl sin BSO.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin BSO	5129,5±394,6 (n=5)	5246,6±412,9 (n=8)	5349,8±925,4 (n=5)
Con BSO	3947,1±279,4 * (n=5)	4540,1±419,3 (n=7)	4908,7±685,1 (n=7)

c. Entrada de Ca^{2+} extracelular: En respuesta a Tr (0,3 U/mL)

Al ser estimuladas con el agonista, en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM), observamos que se produce un aumento de Ca^{2+} , desde la basal, que corresponde tanto a la salida desde los depósitos intracelulares como a la entrada desde el espacio extracelular. Si bien hay diferencias entre controles vs LCB, no se encontraron diferencias entre las plaquetas tratadas agudamente con BSO vs sin tratamiento (Fig. 18, Tabla D-anexos).



d. Niveles totales de Ca²⁺ plaquetario: En respuesta TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca²⁺ intracelular almacenados en las diversas estructuras intraplaquetarias, se eliminó todo el Ca²⁺ extracelular presente (EGTA 200 μM) y se estimuló su salida con taspigargina e ionomicina, encontrándose diferencias significativas de este incremento entre animales tratados agudamente con BSO vs sin tratar, en controles y en LCB de 21 días (Fig. 19 y Tabla 14).

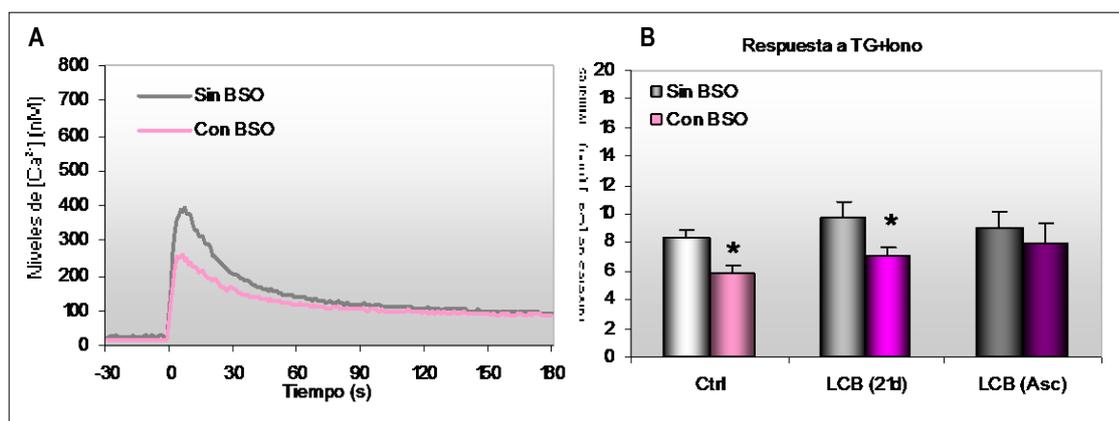


Figura 19: (A) Cambios del Ca²⁺ intracelular y (B) Área bajo la curva, en respuesta a TG + Ionomicina, en ausencia de Ca²⁺ (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con y sin BSO, en animales control, LCB de 21 días y ascitis. (*): p<0,05 vs mismo grupo sin BSO.

Tabla 14: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca²⁺ liberado en respuesta a TG + Ionomicina, en plaquetas de animales control, LCB 21 días y ascitis, tratadas agudamente con BSO.

(*): p<0,05 vs mismo grupo sin BSO.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin BSO	8367,2 ±457,6 (n=5)	9700±1162,9 (n=7)	8969,4±1187,8 (n=7)
Con BSO	5791,5±632,6 * (n=5)	7075,4±502,8 * (n=7)	7880,5±1435,6 (n=7)

e. Entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC)

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la estimulación con TG y/o TBHQ da lugar a un aumento de Ca^{2+} intracelular, siendo mayor en plaquetas de ratas LCB con y sin tratamiento con BSO (Fig. 20 A y B). El tratamiento con BSO produjo una disminución significativa, tanto en respuesta a la taspigargina como al adicionar Ca^{2+} , en ratas LCB de 21 días (Fig. 20 C, Tabla 15).

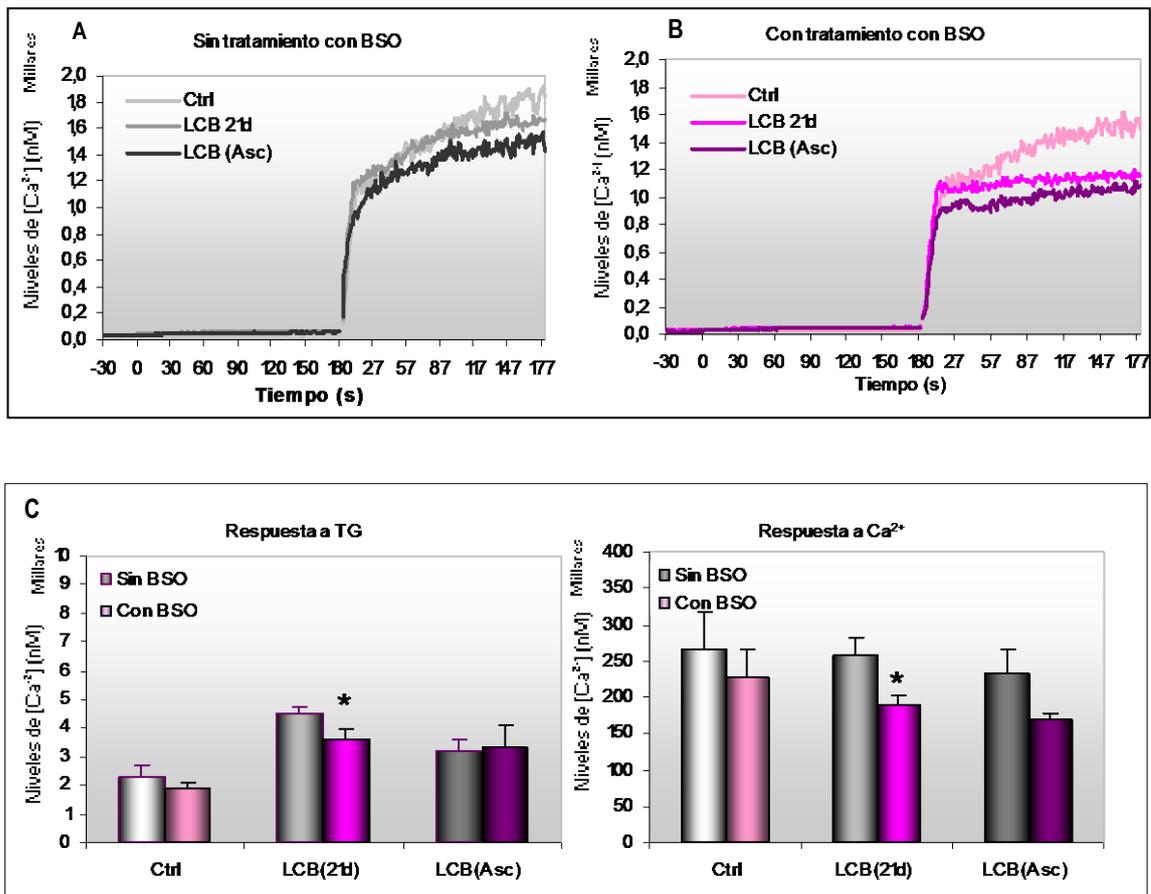


Figura 20: Entrada Capacitativa de Ca^{2+} (ECC). (A) Efecto de la TG sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular y tras la adición de Ca^{2+} ; en plaquetas sin tratamiento agudo con BSO y (B) con tratamiento agudo con BSO, (C) Área bajo la curva de la ECC tras la adición de TG y Ca^{2+} , en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis tratadas agudamente con y sin BSO. (*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin BSO.

Tabla 15: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a TG y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en plaquetas tratadas agudamente con BSO, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis.
(*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin/tto BSO.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin tto BSO			
TG	2326,1±407,3	4487,2± 216,7	3187,3± 449,6
Ca^{2+}	266693,4±51707,4 (n=5)	257848,2±24531 (n=7)	231949,1±33575,5 (n=5)
Con tto BSO			
TG	1871,7±224,2	3631,26±296,1 *	3342,6±779
Ca^{2+}	228653,8±36085,5 (n=5)	190139,1± 12627,8 * (n=7)	168913,8±8863,1 (n=5)

En general, el vaciamiento de los almacenes de NO, con BSO, produjo una menor ECC, siendo esta disminución significativa en las plaquetas del grupo LCB 21 días, con respecto al grupo control y a su mismo grupo sin tratar (Fig. 21 C, Tabla 16).

Tabla 16: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+} intracelular en respuesta a TBHQ y tras la adición de Ca^{2+} extracelular en plaquetas tratadas agudamente con BSO, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis.
(*) : $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin/BSO.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin tto BSO			
TBHQ	2413,8 ± 541,1	3461,5 ± 323,5	2910,5 ± 197,3
Ca^{2+}	120907,4± 23338,6 (n=5)	111895 ± 14439,8 (n=7)	88530,7 ± 4879,4 (n=6)
Con tto BSO			
TBHQ	2117,2 ± 237	2754,5 ± 175	2288,7 ± 308,9
Ca^{2+}	101310,3±16184,3 (n=5)	76002,8±5233 * (n=7)	78956,3 ± 5530,2 (n=5)

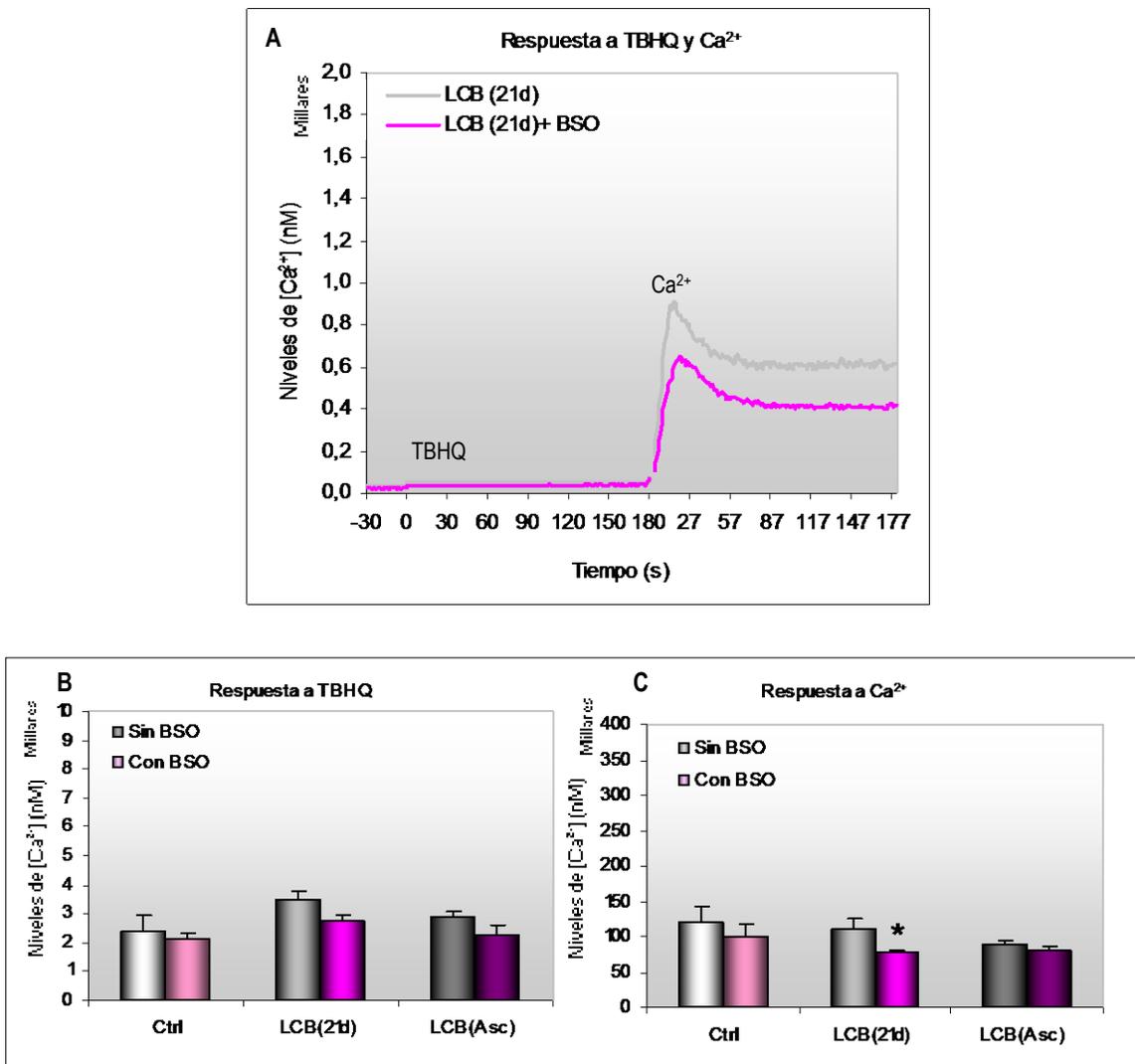


Figura 21: Entrada capacitativa de Ca²⁺ (ECC). **(A)** Efecto del TBHQ sobre los niveles de Ca²⁺ intracelular, en ausencia Ca²⁺ extracelular y tras la adición de Ca²⁺; en plaquetas con y sin tratamiento agudo con BSO en LCB de 21 días, **(B)** Área bajo la curva del efecto de la TBHQ y **(C)** tras la adición de Ca²⁺, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis tratadas agudamente con BSO. (*), p<0,05 vs LCB (21d) sin BSO.

3.2 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

3.2.1 EN RESPUESTA A H_2O_2 , Trombina y ADP

En la figura 22 se representan los cambios de ROS en los diferentes grupos experimentales tras la adición de H_2O_2 (1 mM), siendo similares en todos los grupos de estudio (Fig. 22, Tabla 17).

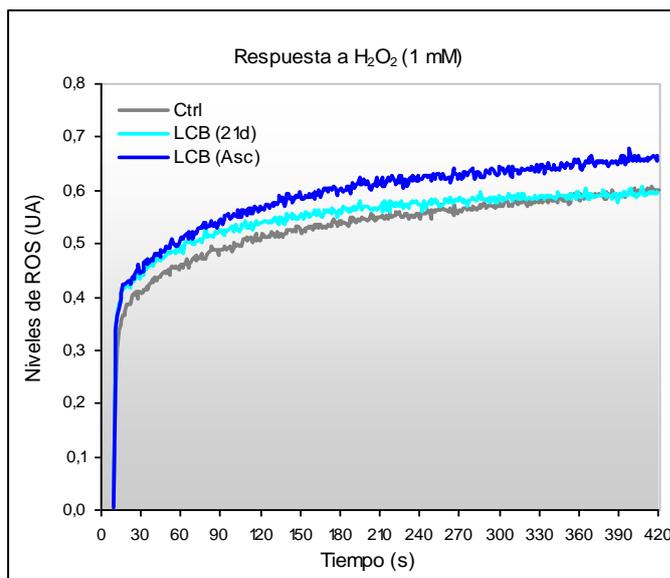


Figura 22: Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a H_2O_2 (1 mM), (420 s de registro ó 7 min), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis.

Tras la estimulación con Tr (0,3 U/mL), las plaquetas de animales cirróticos producen más ROS que el grupo control, pero la presencia de ascitis aumenta aun más dicha producción ($p < 0,05$) (Fig. 23, Tabla 17).

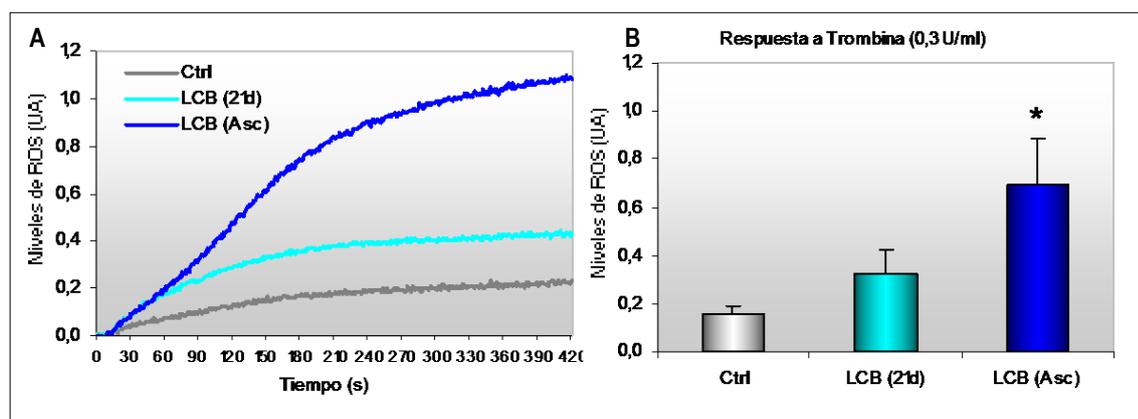


Figura 23: (A) Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a Tr (0,3 U/mL), (B) mismos datos, expresados en área bajo la curva, (420 s de registro ó 7 min), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

La producción de ROS tras la estimulación con ADP (5 μ M) fue casi inapreciable tanto para controles como para animales cirróticos (Fig. 24, Tabla 17).

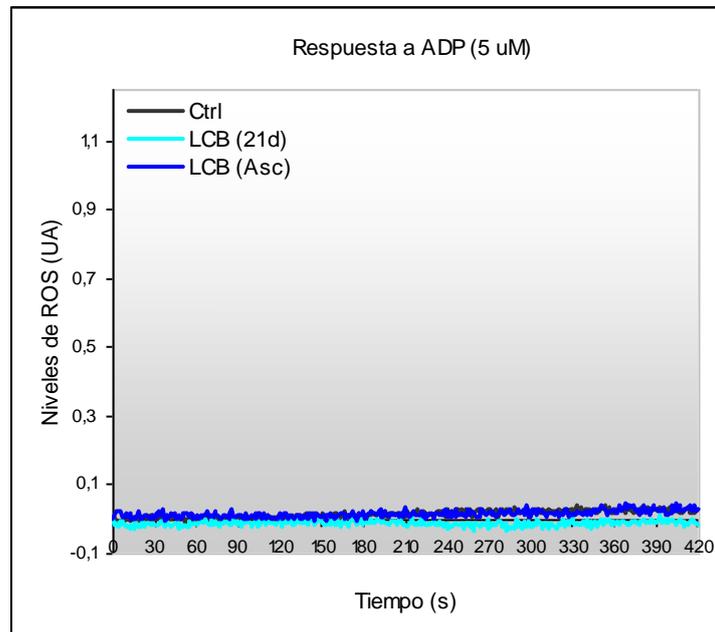


Figura 24: Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a ADP (5 μ M) (420 s de registro ó 7 min), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis.

Tabla 17: Valores del área bajo la curva expresada en unidades arbitrarias (UA) de los niveles de ROS en respuesta a H₂O₂, trombina y ADP en animales control, LCB de 21 días y con ascitis. (*): p<0,05 vs Ctrl.

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
H ₂ O ₂ (1mM)	0,5±0,1 (n=14)	0,5± 0,1 (n=8)	0,6±±0,1 (n=10)
Tr (0,3 U/mL)	0,1±0,01 (n=8)	0,3±0,1 (n=7)	0,7±0,2 * (n=5)
ADP (5 μ M)	0,01± 0,01 (n=8)	0,01±0,01 (n=4)	0,01±0,01 (n=5)

4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS FACTORES PLASMÁTICOS (*Factores extrínsecos*)

4.1 EFECTO AGUDO DE LAS CITOQUINAS Y DE LA BUTIONINA SULFOXIMINA (BSO): sobre la expresión de P-selectina

Tras la incubación con IL-6 y TNF- α y la posterior activación con ADP (5 μ M), no se encontró ningún efecto de las citoquinas sobre la expresión de la P-selectina con respecto a su control basal (salino), para cada grupo de estudio.

Sin embargo, se mantienen sus altos niveles de expresión, en ratas LCB de 21 días, con respecto al grupo control ($p < 0,05$), tanto para las plaquetas incubadas con salino como para las incubadas con IL-6 y TNF- α (Tabla 18).

Tabla 18: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en respuesta a ADP (5 μ M), en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con IL-6 y TNF- α . (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

	Ctrl Sin/tto (n=3)	LCB (21d) Sin/tto (n=3)	LCB (Asc) Sin/tto (n=3)
Salino	29,8 \pm 1,6	76,3 \pm 0,7 *	26,95 \pm 0,6
IL-6 (1 μ g/mL)	23,4 \pm 1,7	75,5 \pm 0,7 *	26,9 \pm 1,9
TNF- α (1 μ g/mL)	25,2 \pm 2,4	76,9 \pm 0,3 *	28,9 \pm 2,4

Tras la incubación de 1 hora con BSO y la posterior activación con ADP (5 μ M), no se encontró ningún efecto sobre la expresión de la P-selectina con respecto a su control basal (salino), para cada grupo de estudio.

Pero se mantienen sus altos niveles de expresión, en ratas LCB de 21 días, con respecto al grupo control ($p < 0,05$), tanto para las plaquetas incubadas con salino como para las incubadas con la BSO (Tabla 19).

Tabla 19: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en respuesta a ADP (5 μ M), en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con BSO. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

	Ctrl. Sin/Tto (n=3)	LCB(21d) Sin/Tto (n=3)	LCB(Asc) Sin/Tto (n=3)
Salino	29,8 \pm 1,6	76,3 \pm 0,7 *	26,9 \pm 0,6
BSO (5 mM)	30 \pm 1,2	77,8 \pm 0,4 *	27,1 \pm 1

4.2 EFECTO AGUDO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

4.2.1 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P-selectina

Tras la incubación de 10 minutos con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino, y la posterior activación con ADP (5 μ M), no se encontraron diferencias con respecto a su control basal (salino).

Sin embargo, se mantienen los altos niveles de expresión de la P-selectina en ratas LCB de 21 días, tanto para las plaquetas incubadas con salino como para las incubadas con CDC y DC con respecto al grupo control, ($p < 0,05$) (Fig. 25, Tabla 20).

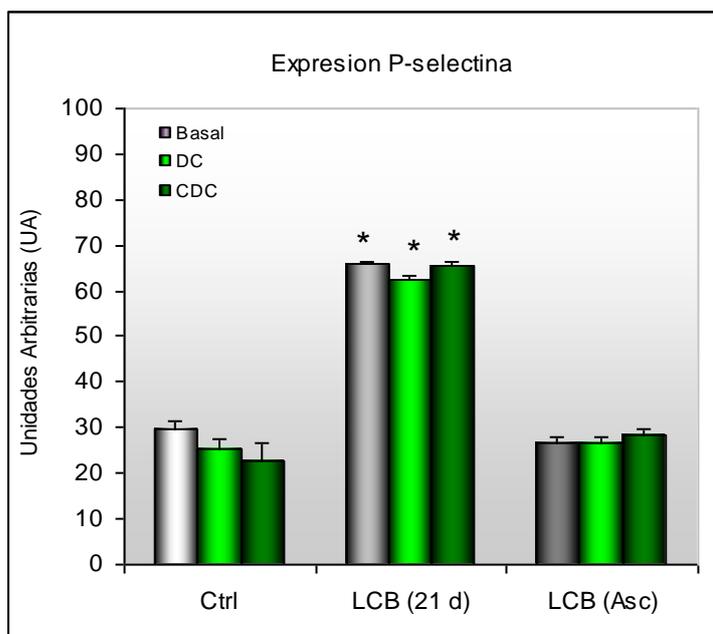


Figura 25: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Tabla 20: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en controles, LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliarios. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

	Ctrl Sin/tto (n=3)	LCB (21d) Sin/tto (n=3)	LCB (Asc) Sin/tto (n=3)
Salino	29,8±1,6	65,8±0,6 *	26,5±1,3
DC (100 μ M)	25,4±2,1	62,5±0,8 *	26,6±1,4
CDC (100 μ M)	22,7±4	65,4±1,1 *	28,2±1,5

4.2.2 MEDICIÓN DEL Ca^{2+} INTRACELULAR

4.2.2.1 Niveles Basales de Ca^{2+} intracelular

Las plaquetas de animales LCB de 21 días y ascitis, tratados agudamente con DC y CDC (100 μ M), presentan niveles basales de Ca^{2+} significativamente más altos que su control salino (Fig. 26, Tabla 21).

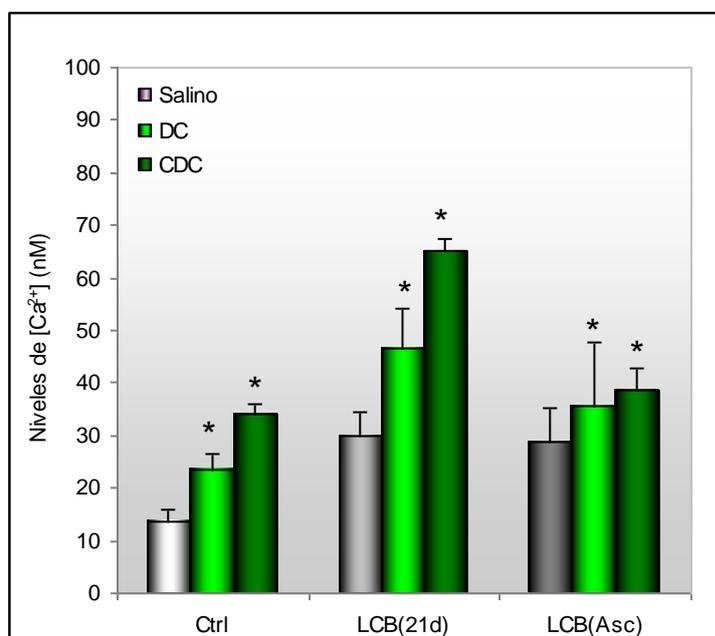


Figura 26: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino como control, en animales LCB de 21 días, ascitis y controles. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo salino.

Tabla 21: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en animales control, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo salino.

	Ctrl (n=6)	LCB (21d) (n=5)	LCB (Asc) (n=6)
Salino	13,6±2	29,9± 3,1	28,9±2,1
DC (100 μM)	23,4±4,4 *	46,7± 7,3 *	35,7±2,1 *
CDC (100 μM)	34,1±6,1 *	65,2±11,8 *	38,7±4,1 *

4.2.2.2 Liberación de Ca^{2+} intracelular: En respuesta a Tr (0,3 U/mL)

Al ser las plaquetas estimuladas con trombina en ausencia de Ca^{2+} extracelular (EGTA 200 μM), se produce un aumento intracelular de Ca^{2+} , debido a la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, siendo mayor en LCB 21 días, pero en este mismo grupo, tras el tratamiento agudo con DC, se produjo una disminución de dicha liberación de Ca^{2+} de manera significativa con respecto a su control salino (Fig. 27, Tabla 22).

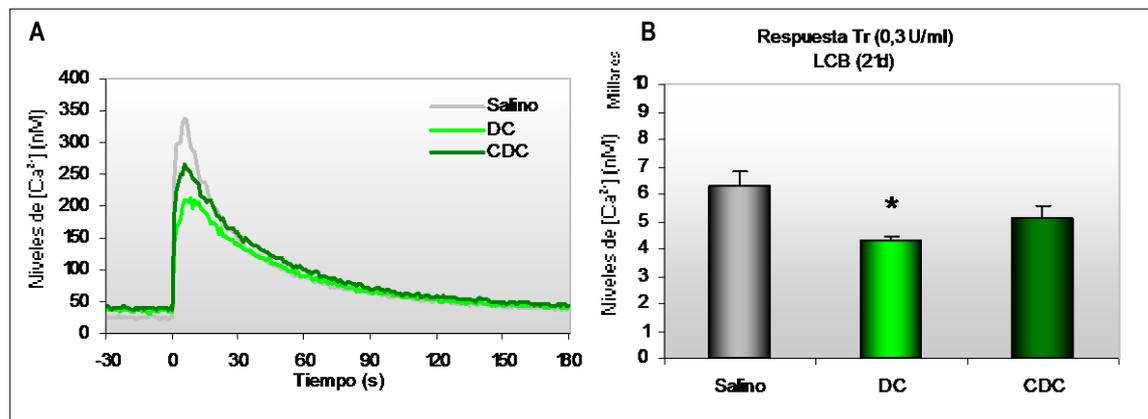


Figura 27: (A) Cambios del Ca^{2+} intracelular y (B) representación del área bajo la curva, de la liberación de Ca^{2+} intracelular (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino como control, en animales LCB de 21 días. (*): $p < 0,05$ vs salino.

Tabla 22: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca^{2+} intracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) salino.

	Ctrl (n=6)	LCB (21d) (n=5)	LCB (Asc) (n=6)
Salino	4794,2±514,8	6274,4± 567,3	5444,6±758,7
DC (100 μM)	4289,3±496	4281±192,5 *	4629,1±691,2
CDC (100 μM)	4125,6±489,1	5122,3±452,5	4295,8±632,2

4.2.2.3 Entrada de Ca^{2+} extracelular: En respuesta a Tr (0,3 U/mL)

Al ser estimuladas con el agonista, en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM), observamos que hay un aumento de Ca^{2+} , desde la basal, que corresponde tanto a la salida desde los depósitos intracelulares, como a la entrada desde el espacio extracelular. Observamos que el tratamiento agudo con ácido desoxicólico (DC) produce una disminución significativa de dicha entrada de Ca^{2+} extracelular y de los depósitos, tanto en plaquetas de animales control como en LCB respecto a su control salino (Fig. 28, Tabla 23).

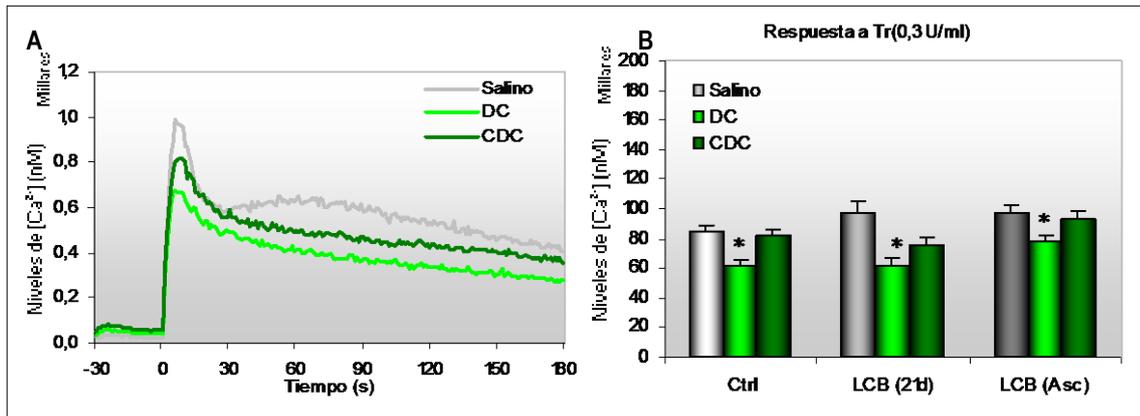


Tabla 23: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca^{2+} extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (*): $p < 0.05$ vs mismo grupo salino.

	Ctrl (n=6)	LCB (21d) (n=5)	LCB (Asc) (n=6)
Salino	84544,7±4524,2	97889,7±7025,1	97676,6±4469,5
DC (100 μ M)	62195,8±4185,3 *	61936,3±5735,4 *	77516,1±5331,1 *
CDC (100 μ M)	81976,1±5254,7	75173,7±9448,9	93690,4±4786,5

4.2.2.4 Niveles totales de Ca^{2+} plaquetario: En respuesta TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca^{2+} intracelular almacenados en las diversas estructuras intraplaquetarias, se eliminó todo el Ca^{2+} extracelular presente (EGTA 200 μ M) y se estimuló su salida con tapsigargina más ionomicina. En este caso no encontramos diferencias significativas de este incremento entre animales tratados agudamente con ácido desoxicólico (DC) y ácido quenodesoxicólico (CDC), en relación con su mismo grupo salino (Fig. 29, Tabla E-Anexos).

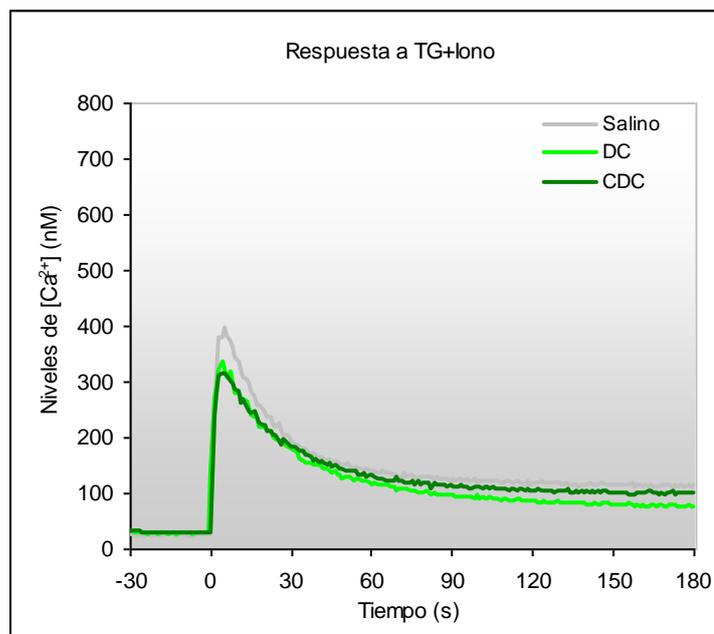


Figura 29: Cambios del Ca^{2+} intracelular de los niveles totales de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con ácido desoxicólico (DC), ácido quenodesoxicólico (CDC) y salino, representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.

4.2.2.5 Entrada capacitativa del Ca²⁺ (ECC): En respuesta a TG y/o TBHQ

En ausencia de Ca²⁺ extracelular, la estimulación con tapsigargina da lugar a un aumento de Ca²⁺ intracelular, siendo mayor en plaquetas de ratas LCB. El tratamiento agudo con el ácido desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC) produce un aumento de Ca²⁺ intracelular tanto en controles como en ratas LCB comparadas con su mismo control salino, pero siendo de forma más significativa mayor en los animales control, pero solo para el tratamiento con CDC (Fig. 30A, Tabla 24A).

Posteriormente al adicionar Ca²⁺ al medio extracelular, se produce un gran aumento de Ca²⁺ intracelular debido a la ECC. Este aumento de Ca²⁺ es mayor en controles que en ratas cirróticas Pero el tratamiento agudo con el DC y CDC produce, de forma significativa, un menor ingreso de Ca²⁺ extracelular tanto en controles como en ratas LCB comparadas con su mismo control salino, (Fig. 30B, Tabla 24B).

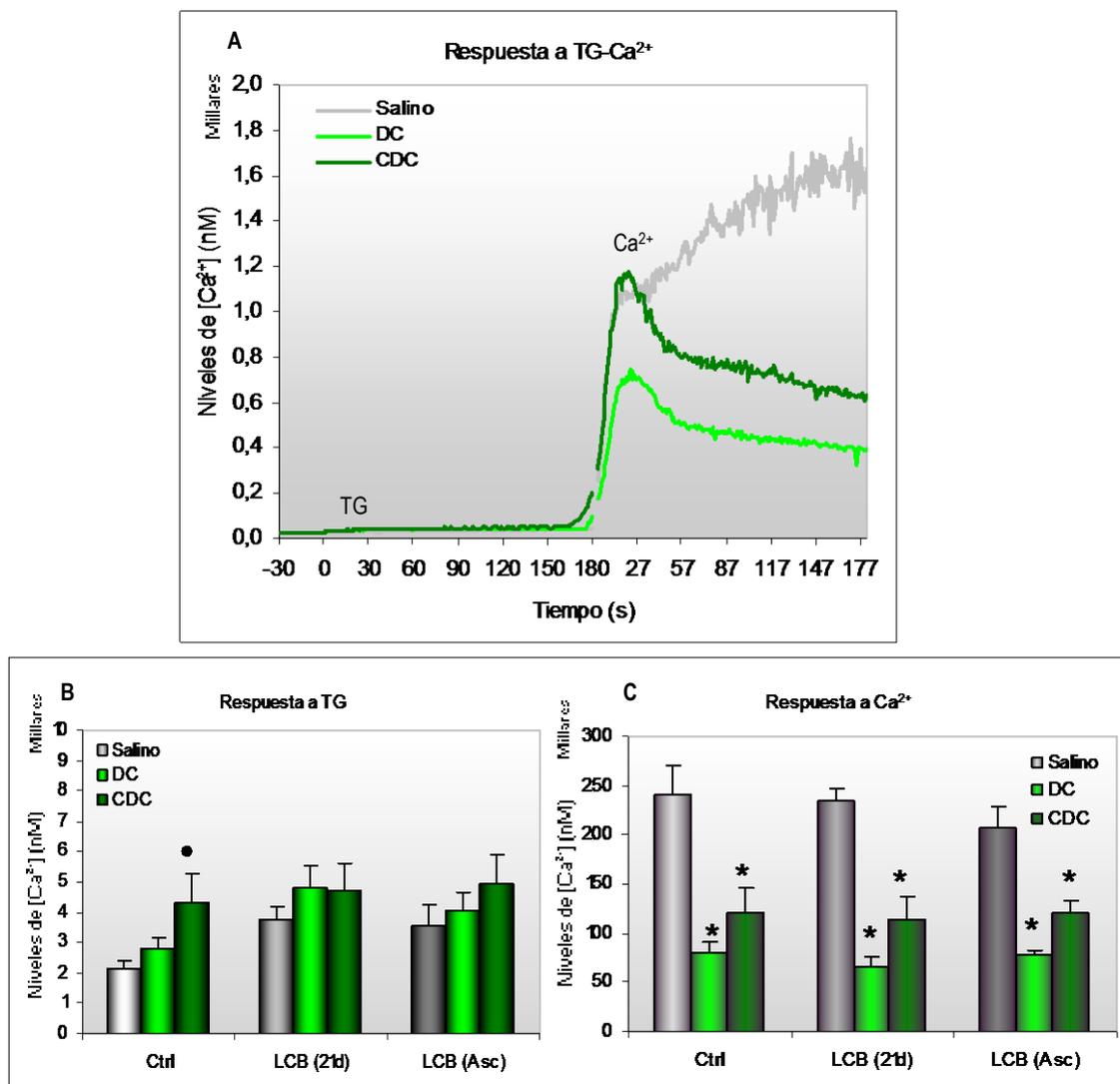


Figura 30: Entrada Capacitativa de Ca²⁺ (ECC). **(A)** Cambios del Ca²⁺ intracelular del efecto de la TG y Ca²⁺. **(B)** Área bajo la curva de la ECC, en respuesta a la TG y **(C)** en respuesta a Ca²⁺, en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tratadas agudamente con ácido quenodesoxicólico (CDC), ácido desoxicólico (DC) y salino como control basal. (●): p<0,05 vs LCB (21d) salino; (*): p<0,05 vs mismo grupo salino.

Tabla 24: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la ECC (A) en respuesta a TG y (B) en respuesta a Ca^{2+} extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (●): $p < 0,05$ vs Ctrl salino; (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo salino.

A				B			
Respuesta a TG	Ctrl (n=6)	LCB(21d) (n=5)	LCB(Asc) (n=6)	Respuesta a Ca^{2+}	Ctrl (n=6)	LCB(21d) (n=5)	LCB(Asc) (n=6)
Salino	2138,3	3745,1	3583	Salino	240062,5	233810,4	206671,5
	± 247,5	± 406	± 655,7		± 30443,2	± 14046	± 21004,5
DC (100 µM)	2823,8	4761,7	4066,9	DC (100 µM)	80827	64741,4	78125,5
	± 326,3	± 782,8	± 607,3		± 9664,8 *	± 11794,2 *	± 4256,1 *
CDC (100 µM)	4335,8	4702,8	4910,1	CDC (100 µM)	119926	114212,3	120262,3
	± 910,9 ●	± 881,6	± 978,7		± 26293,5 *	± 24036,2 *	± 12111,2 *

Y para el TBHQ, el tratamiento agudo con el ácido desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC) no produce ningún cambio del Ca^{2+} intracelular en ninguno de los grupos de estudio comparados con su control salino. Pero el tratamiento agudo con el DC produce, de forma significativa, un menor ingreso de Ca^{2+} extracelular tanto en controles como en ratas LCB comparadas con su mismo control salino, y el ácido CDC solo se ve que disminuye en animales LCB con ascitis (Fig. 31, Tabla 25).

Tabla 25: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada capacitativa de Ca^{2+} extracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo salino.

Respuesta a Ca^{2+}	Ctrl (n=6)	LCB (21d) (n=5)	LCB (Asc) (n=6)
Salino	93394,4±5859,4	103488±25993,7	122119,9±7258,9
DC (100 µM)	9813,5±6978,8 *	41534,8±15836,2 *	65673,1±8070,3 *
CDC (100 µM)	67611,2±15215,4	87677,3±28655,5	94845,5±9764,6 *

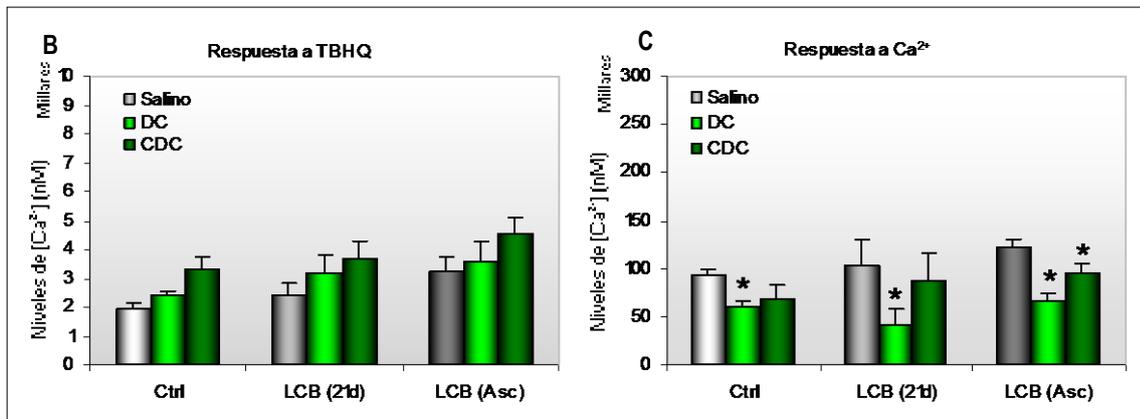
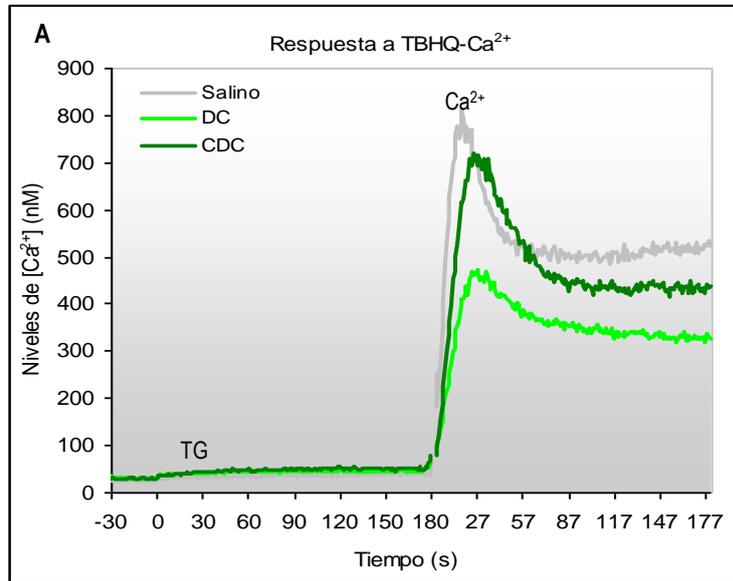


Figura 31: Entrada capacitativa de Ca²⁺ (ECC). **(A)** Cambios del Ca²⁺ intracelular del efecto de la TBHQ y Ca²⁺, **(B)** área bajo la curva de la ECC, en respuesta a la TG y **(C)** en respuesta a Ca²⁺, en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tratadas agudamente con ácido quenodesoxicólico (CDC), ácido desoxicólico (DC) y salino como control basal. (*): p<0,05 vs mismo grupo salino.

4.3 EFECTO AGUDO DE LA HOMOCISTEÍNA (HCY)

4.3.1 NIVELES PLASMÁTICOS DE HCY

La Hcy en plasma fue medida en su estado basal y después de la administración de L-metionina (100 mg/Kg i.p.). Basalmente no se observan diferencias entre Ctrl y LCB. Sin embargo, tras la sobrecarga, tanto LCB como Ctrl, presentan niveles elevados de Hcy, siendo en los animales cirróticos los niveles significativamente más altos que en su grupo control (con sobrecarga L-metionina) (Fig. 32, Tabla N-Anexos).

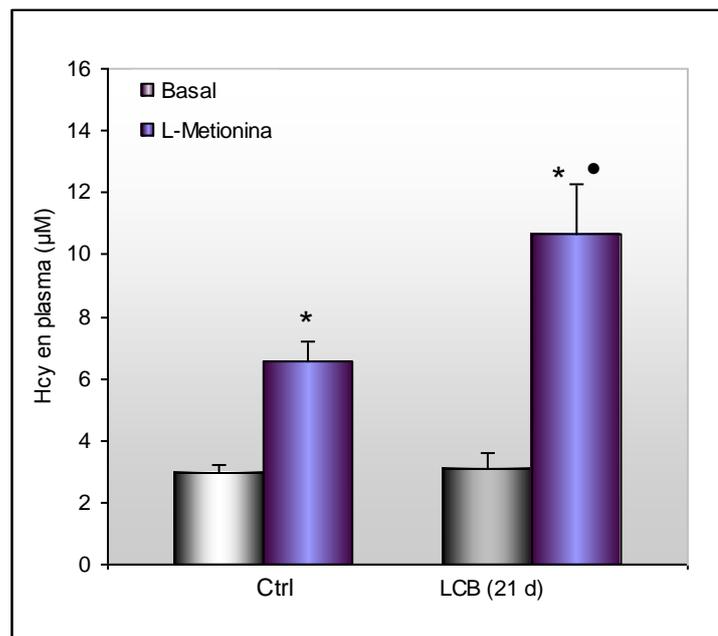


Figura 32: Concentraciones de Homocisteína (Hcy) en plasma. Basal y post-sobrecarga con L-metionina, en animales control y LCB de 21 días. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal; (●): $p < 0,05$ vs Ctrl con sobrecarga L-metionina.

4.3.2 EFECTO AGUDO DE LA HCY EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Para estudiar el efecto agudo de la homocisteína (Hcy) en la agregación plaquetaria, hemos sometido a las plaquetas a una incubación previa con concentraciones de Hcy crecientes (10, 25 y 100 μM) durante 5 minutos a 37 °C y como control basal se incubó con cisteína (Cys). Posteriormente, fueron estimuladas con ADP (5 μM).

Tomando en cuenta el **área de agregación**, el estudio mostró que en las ratas control y LCB (15d y 21d), el tratamiento con Hcy produjo un incremento significativo, con respecto a su basal sin tratamiento, ($p < 0,05$) (Fig. 32, Tabla 26). Pero, en los animales LCB con ascitis no se observaron diferencias significativas con respecto a su basal, ($p < 0,05$) (Fig. 33, Tabla 26).

Pero, si tomamos en cuenta el porcentaje de **agregación máxima**, solo hay diferencias en ratas control, produciéndose un incremento en la agregación a las concentraciones de (25 μ M) ($69,9\pm 4,1$ %) y (100 μ M) ($68,2\pm 2,8$ %) con respecto a su control, ($57,2\pm 2$ %), ($p<0,05$) (Tabla A-Anexos).

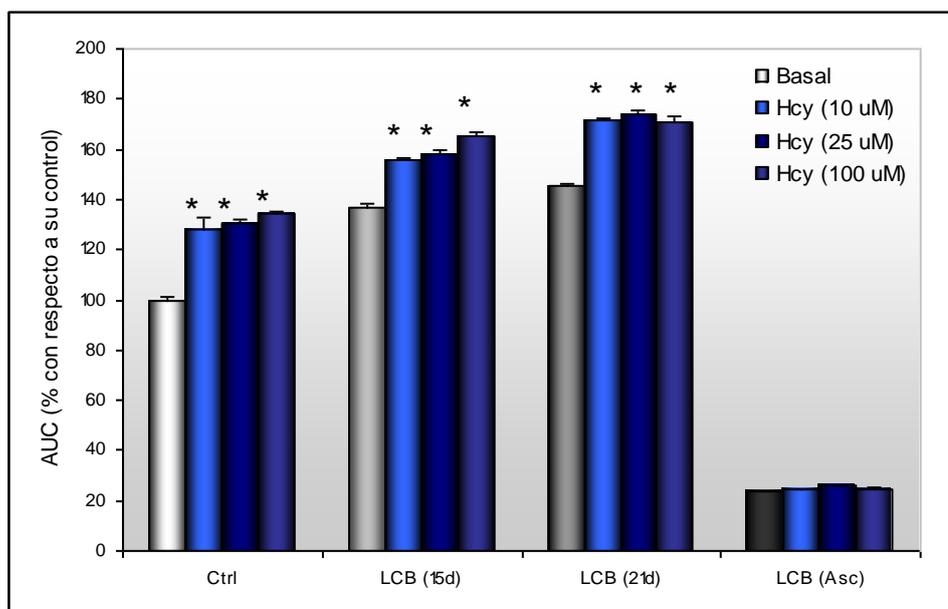


Figura 33: Efecto del tratamiento agudo con Homocisteína (Hcy), a diferentes concentraciones, en el Área de agregación plaquetaria (expresada en %), tras ser estimuladas con ADP (5 μ M), en animales control y LCB de 15, 21 días y ascitis. (*): $p<0,05$ vs mismo grupo basal.

Tabla 26: Valores del área de agregación con respecto al control, expresado en %. En animales control y con LCB de 15, 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con Homocisteína. (*): $p<0,05$ vs mismo grupo basal.

	Ctrl Sin/tto (n=6)	LCB (15d) Sin/tto (n=6)	LCB (21d) Sin/tto (n=7)	LCB (Asc) Sin/tto (n=6)
Basal	100 \pm 0,9	136,9 \pm 1,4	145,2 \pm 0,8	23,4 \pm 0,4
Hcy (10 μ M)	128 \pm 4,3 *	155,5 \pm 1,1 *	171,2 \pm 1,3 *	24,4 \pm 0,5
Hcy (25 μ M)	130 \pm 1,7 *	158,1 \pm 1,7 *	173,5 \pm 1,7 *	25,8 \pm 0,3
Hcy (100 μ M)	134 \pm 1,1 *	165,3 \pm 1,7 *	170,6 \pm 2,2 *	24,5 \pm 0,4

4.3.3 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P-selectina

Tras la incubación con la Hcy y la posterior activación con ADP (5 μ M), no se encontró ningún efecto sobre la expresión de la P-selectina con respecto a su control basal cisteína (Cys), para cada grupo de estudio.

Pero se mantiene, de forma significativa, una mayor expresión de la P-selectina en ratas LCB de 21 días, tanto para las plaquetas incubadas con salino, como para las con Hcy, con respecto al grupo control, ($p < 0,05$) (Fig. 34, Tabla 27).

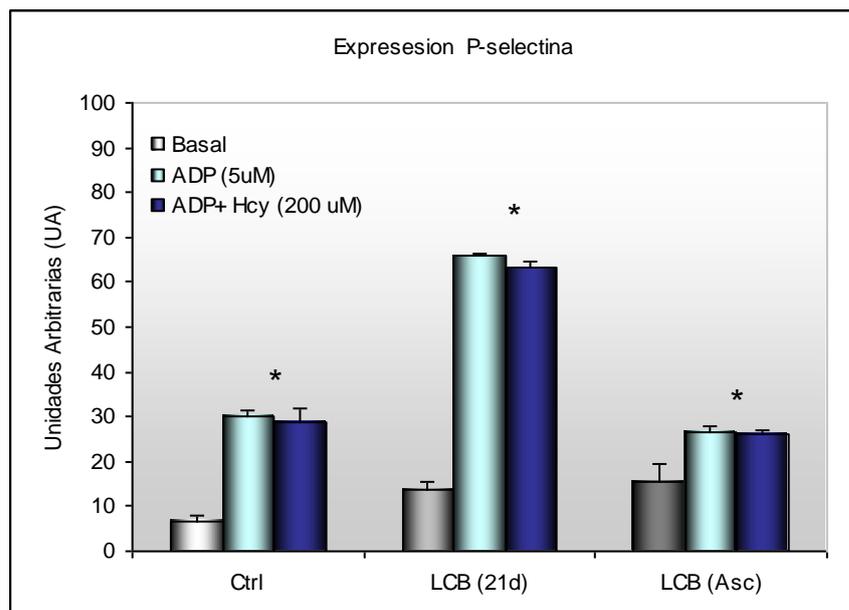


Figura 34: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en plaquetas de animales control y LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo Hcy. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal.

Tabla 27: Valores de expresión de P-selectina en unidades arbitrarias (UA), en controles y con LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con Hcy. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal.

	Ctrl Sin/tto (n=3)	LCB (21d) Sin/tto (n=3)	LCB (Asc) Sin/tto (n=3)
Basal	29,8 \pm 1,6	65,8 \pm 0,6	26,5 \pm 1,3
Hcy (200 μM)	28,5 \pm 3,9 *	63,4 \pm 1,5 *	26,3 \pm 0,8 *

4.3.4 MEDICIÓN DE Ca²⁺ INTRACELULAR

4.3.4.1 Niveles Basales de Ca²⁺ intracelular

Las plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis, tratados agudamente con Hcy (10 y 25 μM), presentan niveles basales de Ca²⁺ más altos que sus controles basales (tratados con cisteína). Pero esta diferencia es estadísticamente significativa en controles y en LCB de 21 días, siendo para este último grupo solo a la concentración de Hcy 25 μM (Fig. 35, Tabla 28).

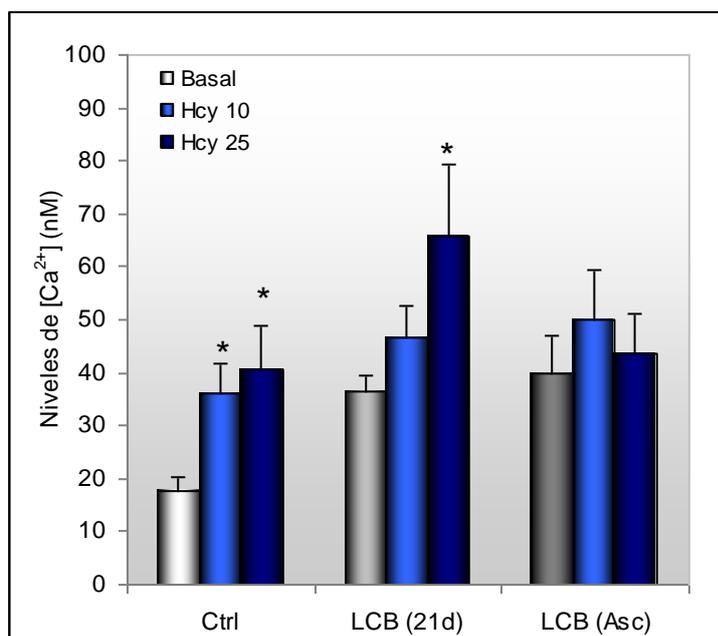


Figura 35: Representación del área bajo la curva, de los niveles basales de Ca²⁺ (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy (10 y 25 μM) y cisteína (Cys) como control basal, en animales control, LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal.

Tabla 28: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles basales de Ca²⁺ intracelular en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo Hcy. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal.

Agonistas	Ctrl Sin/tto (n=5)	LCB (21d) Sin/tto (n=12)	LCB (Asc) Sin/tto (n=6)
Basal	17,5±2,3	36,4±3,1	39,9±7
Hcy (10 μM)	36,2± 5,6 *	46,7±6,1	50,1±9,2
Hcy (25 μM)	40,7±8,2 *	65,8± 13,4 *	43,6±7,4

4.3.4.2 Liberación de Ca²⁺ intracelular: Respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 μM)

Al ser estimuladas con la trombina y ADP (5 μM), en ausencia de Ca²⁺ extracelular (EGTA 200 μM), se produce un aumento intracelular de Ca²⁺, debido a la salida de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. El tratamiento agudo con Hcy a 10 y 25 μM, no produjo ningún aumento en ninguno de los grupos de estudio, para ninguno de los agonistas (Fig. 36, Tabla F-Anexo).

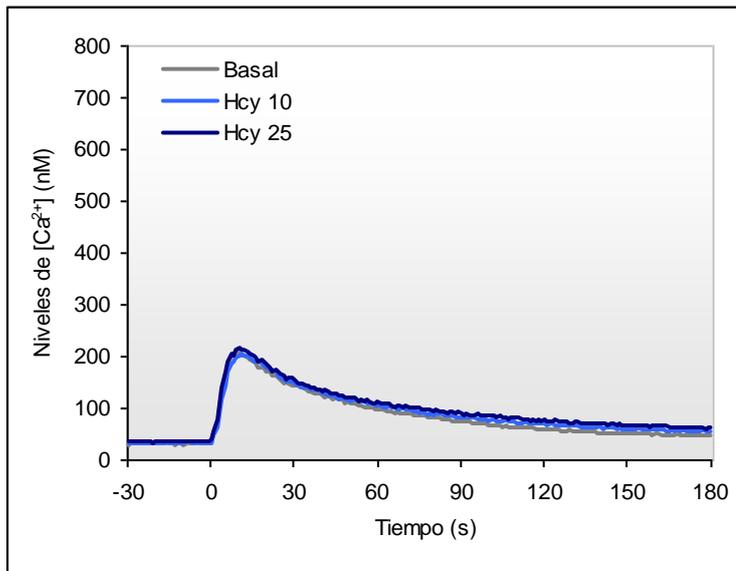


Figura 36: Cambios del Ca²⁺ intracelular de la liberación de Ca²⁺ intracelular (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy, representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.

4.3.4.3 Entrada de Ca²⁺ extracelular: En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL)

El tratamiento agudo con Hcy (10 y 25 μM) no produjo un mayor incremento tras ser estimuladas con Tr (0,1 μM), para ninguno de los grupos de estudio. En cambio con Tr (0,3 μM), la Hcy (10 y 25 μM) produjo una mayor respuesta en animales control y LCB de 21 días, aunque en este último grupo la respuesta fue significativa sólo con Hcy 25 μM (Fig. 37, Tabla 29).

Tabla 29: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca²⁺ extracelular en respuesta a Tr (0,3 U/mL), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con Hcy. (*): p<0,05 vs mismo grupo Cys.

Agonistas	Ctrl Sin/tto (n=7)	LCB (21d) Sin/tto (n=12)	LCB (Asc) Sin/tto (n=6)
Cys	78366,4±3770,7	84107,6±4262,5	98268,5±9620,7
Hcy (10 μM)	106118,1± 11900,8 *	99076,8±8833,6	105979,7±19846,4
Hcy (25 μM)	107675,4±13398,5 *	159484,8± 28008,5 *	96220,6±11617

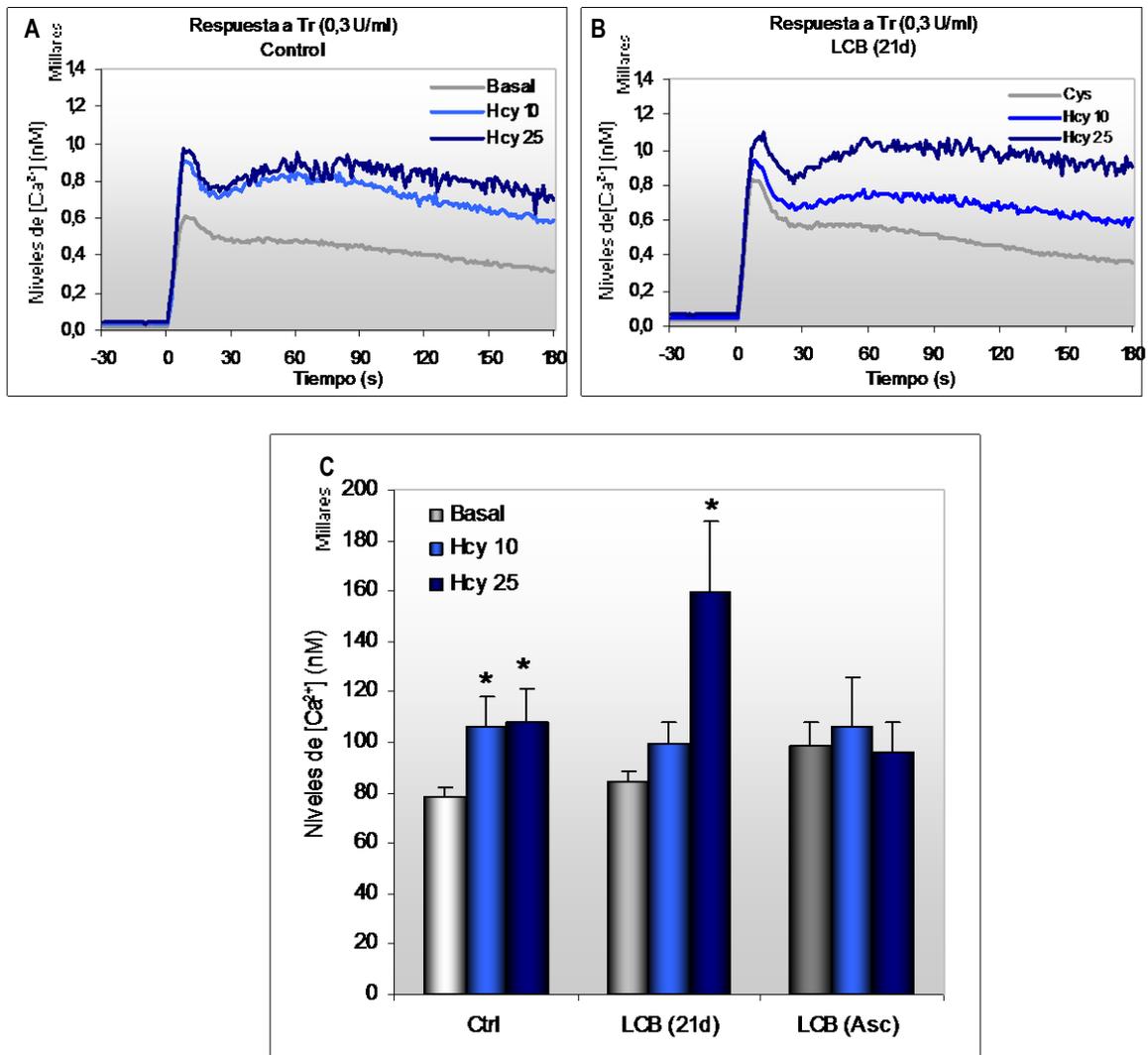


Figura 37: (A) y (B) Cambios del Ca^{2+} intracelular de la Entrada de Ca^{2+} en respuesta a Tr (0,3 U/mL) tras la incubación con Hcy (10 y 25 μM) en animales control y LCB de 21 días, respectivamente (30 s de registro), (C) representación del Área bajo la curva de las figuras (A y B) de plaquetas tratadas agudamente con Hcy (10 y 25 μM) y cisteína (Cys) como control basal, en animales control, LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo Cys.

4.3.4.4 Niveles totales de Ca^{2+} plaquetario: En respuesta TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca^{2+} intracelular almacenados en las diversas estructuras intraplaquetarias, se eliminó todo el Ca^{2+} extracelular presente (EGTA 200 μM) y se estimuló su salida con TG más ionomicina. Observamos que el tratamiento agudo con Hcy (10 y 25 μM) no produjo ningún efecto con respecto a su basal (Cys) para ninguno de los grupos de estudio (Fig. 38, Tabla H-Anexos).

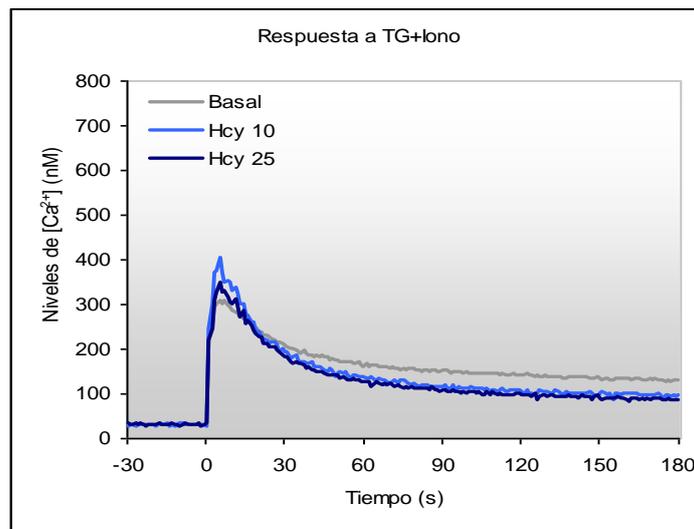


Figura 38: Cambios del Ca^{2+} intracelular de los niveles totales de Ca^{2+} (30 s de registro), de plaquetas tratadas agudamente con Hcy. Representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.

4.3.4.5 Entrada capacitativa del Ca^{2+} (ECC)

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la estimulación con tapsigargina da lugar a un aumento de Ca^{2+} intracelular, siendo mayor en plaquetas de ratas LCB con respecto al control. Este aumento de Ca^{2+} es mayor en ratas cirróticas que en controles. Pero el tratamiento agudo con homocisteína no dio ningún aumento de Ca^{2+} intracelular, ni en controles, ni en animales cirróticos.

Posteriormente, tras adicionar Ca^{2+} al medio extracelular, se produce un gran aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la ECC. Como sabemos, este aumento de Ca^{2+} es mayor en controles que en ratas cirróticas. Pero el tratamiento con Hcy, tampoco produjo ningún cambio comparadas con su control cisteína (Fig. 39, Tabla G-Anexos).

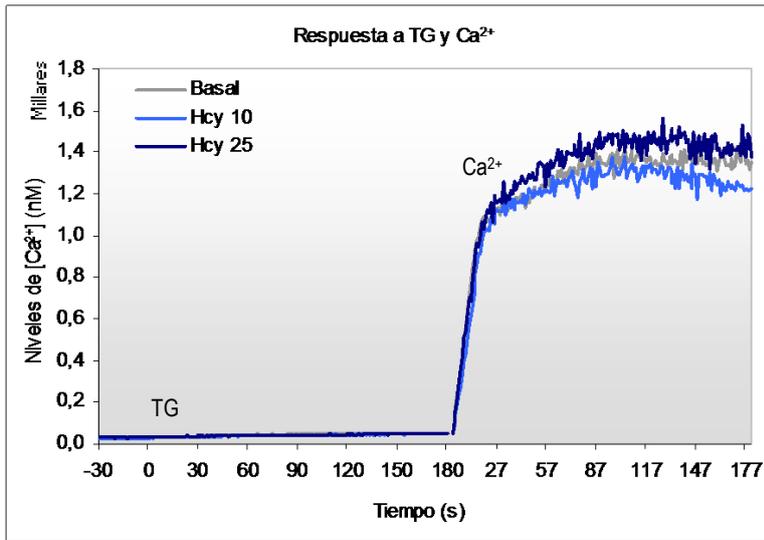


Figura 39: Entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC). Cambios del Ca^{2+} intracelular del efecto de la TG y Ca^{2+} , en plaquetas tratadas agudamente con Hcy. Representación de los tres grupos de estudio: control, LCB de 21 días y ascitis.

4.3.5 PRODUCCIÓN DE ROS

Tras la estimulación con Hcy, podemos observar una mayor producción de ROS en animales LCB con ascitis, llegando a ser su expresión de forma significativa ($p < 0,05$), con respecto a su control; también vemos una clara tendencia, de una mayor producción de ROS, en ratas LCB de 21 días, aunque esta no sea estadísticamente significativa (Fig. 40, Tabla 30).

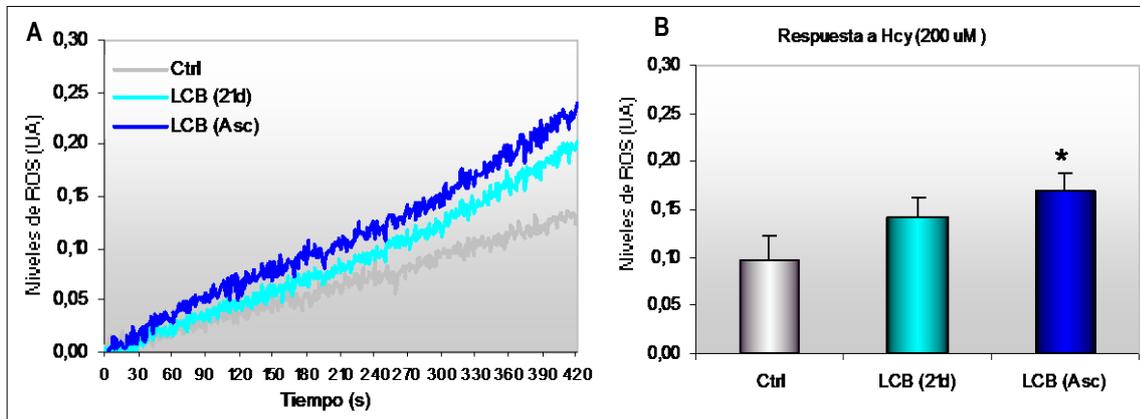


Figura 40: (A) Representación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a Hcy ($200 \mu\text{M}$), (B) mismos datos, pero expresados en área bajo la curva, (420 s de registro ó 7 min), en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

Tabla 30: Valores del área bajo la curva (expresado en UA) de los niveles de ROS en respuesta a Hcy en animales control, LCB de 21 días y con ascitis.

(*): $p < 0,05$ vs Ctrl

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Hcy ($200 \mu\text{M}$)	$0,1 \pm 0,02$ (n=8)	$0,1 \pm 0,02$ (n=5)	$0,2 \pm 0,02$ * (n=5)

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ÁCIDO FÓLICO

5.1 MEDICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Nuestros resultados muestran que el ácido fólico disminuye la agregación plaquetaria, tanto en ratas LCB como controles, siendo el efecto mayor en las plaquetas del grupo con LCB sin ascitis. El tratamiento tiende a disminuir el **porcentaje de agregación máxima**, siendo significativamente menor la agregación en el grupo LCB de 15 días y en los animales con ascitis (Fig. 41, Tabla 2 y 31). En el **área de agregación**, vemos más claramente los efectos del tratamiento, de manera que ambos, el grupo control y LCB de 15 y 21 días tratados con ácido fólico muestran una gran disminución con respecto a su grupo sin tratar ($p < 0,05$), siendo esta disminución mucho más acusada en el grupo LCB 15 y 21 días (Fig. 42 y 43, Tabla 32). En el grupo LCB con ascitis, el área de agregación se encuentra muy disminuida en ausencia de tratamiento, por lo que el ácido fólico no produce ningún efecto (Fig. 42, Tabla 31).

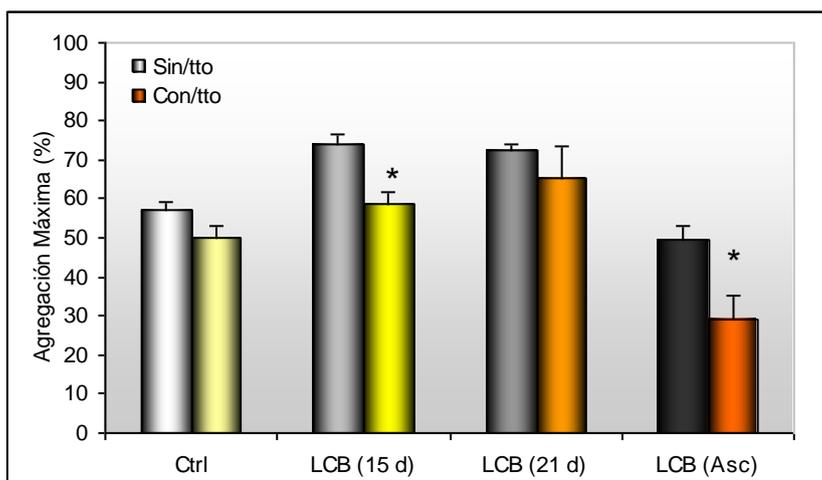


Figura 41: Efecto del ácido fólico en la **agregación máxima** plaquetaria expresada en porcentaje, en respuesta al ADP (5 μ M) en ratas control y LCB de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo sin/tto.

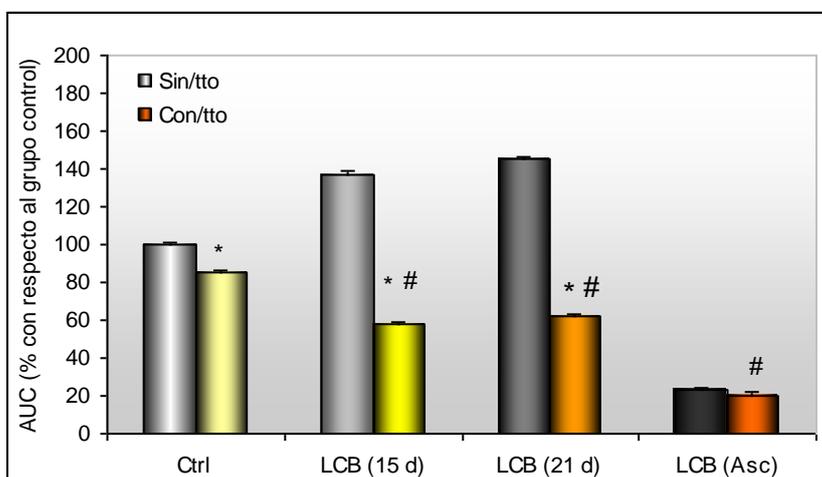


Figura 42: Efecto del tratamiento crónico del Ácido fólico en el **área de agregación** plaquetaria en animales control y LCB, en respuesta al ADP (5 μ M). (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo sin/tto; (#): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

Tabla 31: Valores de agregación plaquetaria, expresada en %, para el área y agregación máxima. En animales control y con LCB de 15, 21 días y con ascitis, tratadas crónicamente con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

	Ctrl Con/tto (n=7)	LCB(15d) Con /tto (n=6)	LCB (21d) Con /tto (n=6)	LCB(Asc) Con /tto (n=6)
Área de Agregación	84,8±1,6	58,3±0,5 *	61,7±1,1 *	20,3±1,7 *
Agregación Máxima	49,7±3,5	58,8±2,8	65,3±8	29,1±6,1 *

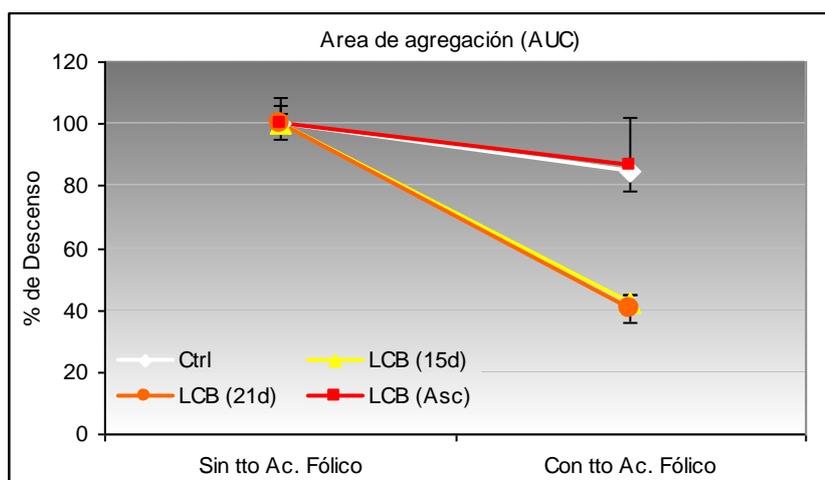


Figura 43: Porcentaje de descenso en el área de agregación plaquetaria, tras el tratamiento crónico con Ácido fólico, en los diferentes grupos experimentales.

Tabla 32: Efecto del tratamiento del ácido fólico, expresado en % de descenso en el área de agregación. En controles y con LCB de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs LCB (15 d) sin/tto. (♦): $p < 0,05$ vs LCB (21 d) sin/tto.

Área de Agregación	Área de Agregación	% Descenso
Control Sin/tto (n=6)	Control Con/tto (n=7)	15,1
LCB(15d) Sin/tto (n=6)	LCB(15d) Con/tto (n=6)	57,4
LCB(21d) Sin/tto (n=7)	LCB(21d) Con/tto (n=6)	57,4
LCB(Asc) Sin/tto (n=6)	LCB(Asc) Con/tto (n=6)	13,2

5.2 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P-Selectina

5.1.1 CONDICIONES BASALES

Tras el tratamiento crónico con ácido fólico, básalmente, es decir en ausencia de estímulo, hay una mayor expresión del receptor para la P-selectina, en LCB de 21 días y con ascitis con respecto al grupo control tratado, ($p < 0,05$) (Fig. 44, Tabla 33).

Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre animales tratados versus sin tratar con ácido fólico, para ninguno de los grupos de estudio (Fig. 44 y Tablas 33 y 3 ref. Sin/tto).

5.2.2 RESPUESTA A ADP (5 μ M)

La incubación con ADP (5 μ M), durante 10 minutos o 1 hora a 37 °C en animales tratados con ácido fólico aumenta la expresión de P-selectina (Fig. 44, barras naranjas), en ratas LCB de 21 días y ascitis con respecto a su control basal sin activar ($p < 0,05$). El tratamiento con ácido fólico disminuye la respuesta a ADP en todos los grupos experimentales (Fig. 44, Tabla 33).

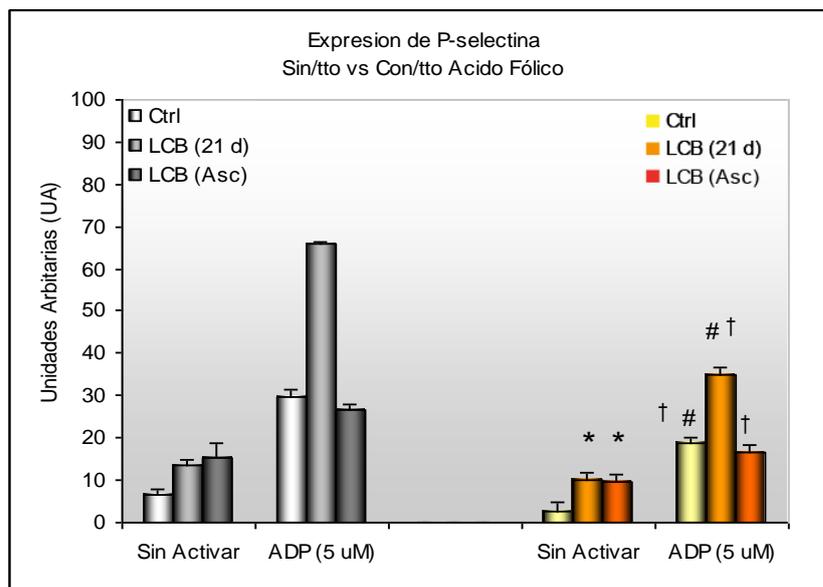


Figura 44: Comparación del efecto del tratamiento crónico del ácido fólico (barras naranjas) vs sin tratamiento con ácido fólico (barras grises), en la expresión de la P-selectina. Respuesta basal (sin activación) y tras la activación con ADP (5 μ M) (con 1 hr de incubación con salino) en ratas control, LCB de 21 días y con Ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto; (#): $p < 0,05$ vs basal con/tto mismo grupo, (†) $p < 0,05$ vs sin/tto mismo grupo.

Tabla 33: Valores de expresión de P-selectina, en unidades arbitrarias (UA), en ratas control y con LCB de 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

	Ctrl Con/tto (n=3)	LCB (21d) Con /tto (n=4)	LCB (Asc) Con /tto (n=3)
Sin Activar	2,8±1,8	10,7±1,7 *	9,4±1,9 *
ADP (5 µM) - 10 min	18,6±1,4	35,1±1,3 *	16,5±1,7
ADP (5 µM) - 1 hr	16,4±1,2	44±0,6 *	16,1±1,3

5.2.3 EFECTO DE LA INCUBACIÓN AGUDA CON HCY, CITOQUINAS, BSO Y ÁCIDOS BILIARES, SOBRE LA EXPRESIÓN DE P-Selectina EN RESPUESTA AL ADP

El tratamiento agudo con Hcy, BSO, ácidos biliares y citoquinas, no altera la expresión de P-selectina en respuesta a ADP (5 µM), en ningún grupo experimental. (Fig. 45 lado derecho, Tabla 34).

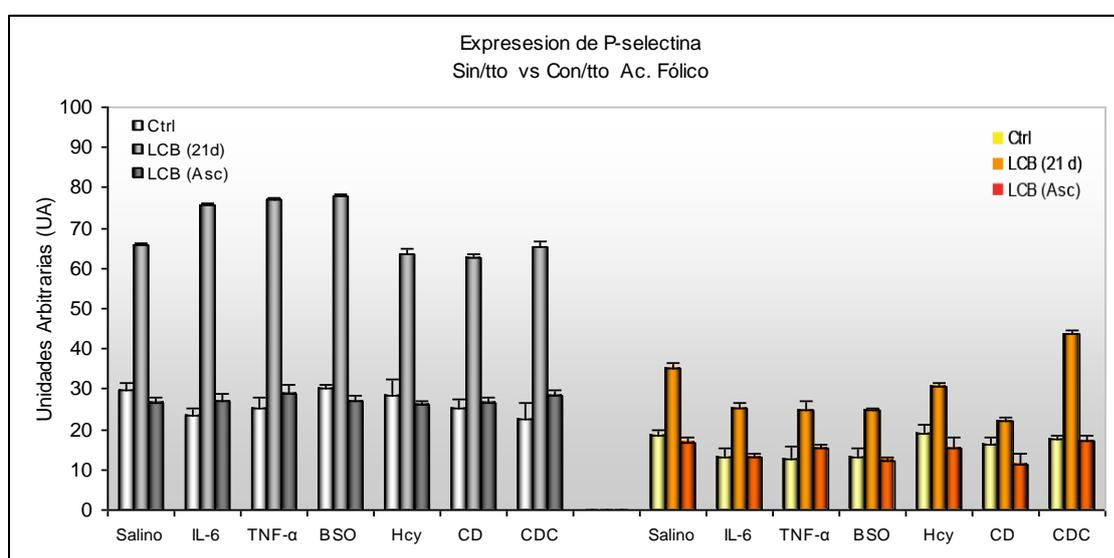


Figura 45: Efecto del tratamiento crónico del ácido fólico en la expresión de la P-selectina en respuesta a ADP (5 µM) en plaquetas incubadas con IL-6 (1 µg/mL), TNF-α (1 µg/mL), BSO (5 mM), Hcy (200 µM), DC (100 µM) y CDC (100 µM) durante 1 hr.



Tabla 34: Valores de expresión de P-selectina, en respuesta a ADP, en unidades arbitrarias (UA), en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, sin y con tratamiento crónico con ácido fólico. (+): $p < 0,05$ vs Ctrl sin/tto. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto. NR: no realizado.

Agonistas	Ctrl Sin/tto (n=3)	LCB (21d) Sin/tto (n=3)	LCB (Asc) Sin/tto (n=3)	Ctrl Con/tto (n=3)	LCB (21d) Con /tto (n=4)	LCB (Asc) Con /tto (n=3)
ADP (5 μ M)	NR	NR	NR	16,4 \pm 1,2	44 \pm 0,6 *	16,2 \pm 1,3
IL-6 (1 μ g/mL)	23,4 \pm 1,7	75,5 \pm 0,7 +	26,9 \pm 1,9	13,1 \pm 2,03	25,4 \pm 1,2 *	13,2 \pm 0,5
TNF- α (1 g/mL)	25,3 \pm 2,5	76,9 \pm 0,4 +	28,8 \pm 2,4	12,6 \pm 2,9	24,6 \pm 2,2 *	15,1 \pm 1,3
BSO (5 mM)	30 \pm 1,2	77,8 \pm 0,4 +	27,1 \pm 1	13,2 \pm 2	24,6 \pm 0,6 *	12,1 \pm 1
Hcy (200 μ M)	28,5 \pm 3,9	63,3 \pm 1,5 +	26,3 \pm 0,87	19 \pm 2,1	30,5 \pm 1,1 *	15,3 \pm 2,7
DC (100 μ M)	25,3 \pm 2,1	62,5 \pm 0,8 +	26,5 \pm 1,4	16,2 \pm 1,1	21,8 \pm 1 *	11,1 \pm 2,9
CDC(100 μ M)	22,7 \pm 4	65,4 \pm 1,1 +	28,2 \pm 1,5	17,6 \pm 0,9	43,6 \pm 0,9 *	17,3 \pm 1,3

5.3 MEDICIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR

5.3.1 EFECTO DEL ÁCIDO FÓLICO SOBRE LOS NIVELES BASALES DE Ca^{2+}

El tratamiento crónico con ácido fólico no produjo ningún efecto sobre los niveles basales de Ca^{2+} plaquetario en animales control, LCB de 21 días y ascitis.

5.3.2 LIBERACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR:

En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 μ M)

En los animales tratados con ácido fólico, la liberación intracelular de Ca^{2+} en respuesta a ADP y Tr fue mayor en el grupo LCB 21 días con respecto al control ($p < 0,05$) (Fig. 46-47).

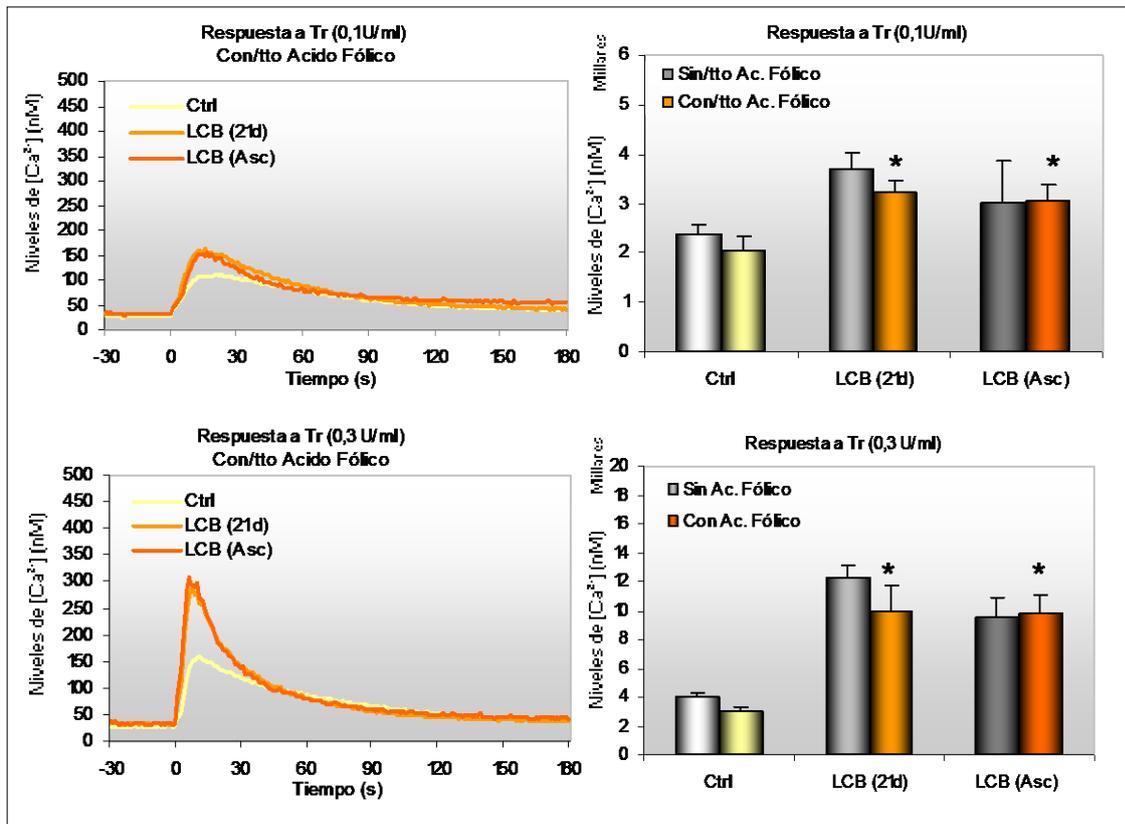


Figura 46: Efecto de la Tr (0,1 y 0,3 U/mL) sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular. A la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

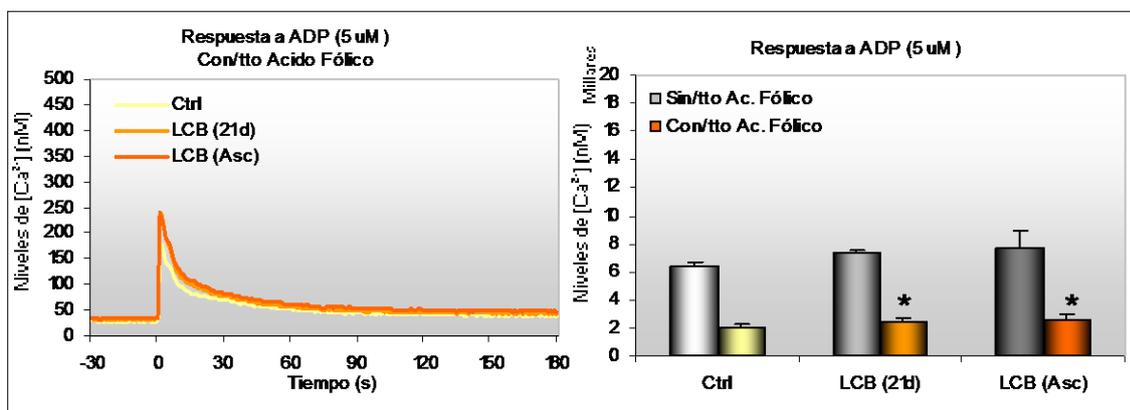


Figura 47: Efecto del ADP (5 μM) sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en ausencia Ca^{2+} extracelular. A la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl con/tto.

5.3.3 ENTRADA DE Ca^{2+} EXTRACELULAR:

En respuesta a Tr (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 μM).

Al ser estimuladas con los agonistas, en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM), observamos un aumento de Ca^{2+} , desde la basal, que corresponde tanto a la salida de este desde los depósitos intracelulares, como a la entrada desde el espacio extracelular. El tratamiento crónico con ácido fólico disminuyó la respuesta de manera significativa, tras ser estimuladas con Tr (0,1 y 0,3 U/mL) en animales LCB de 21 días (Fig. 48, Tabla 35).

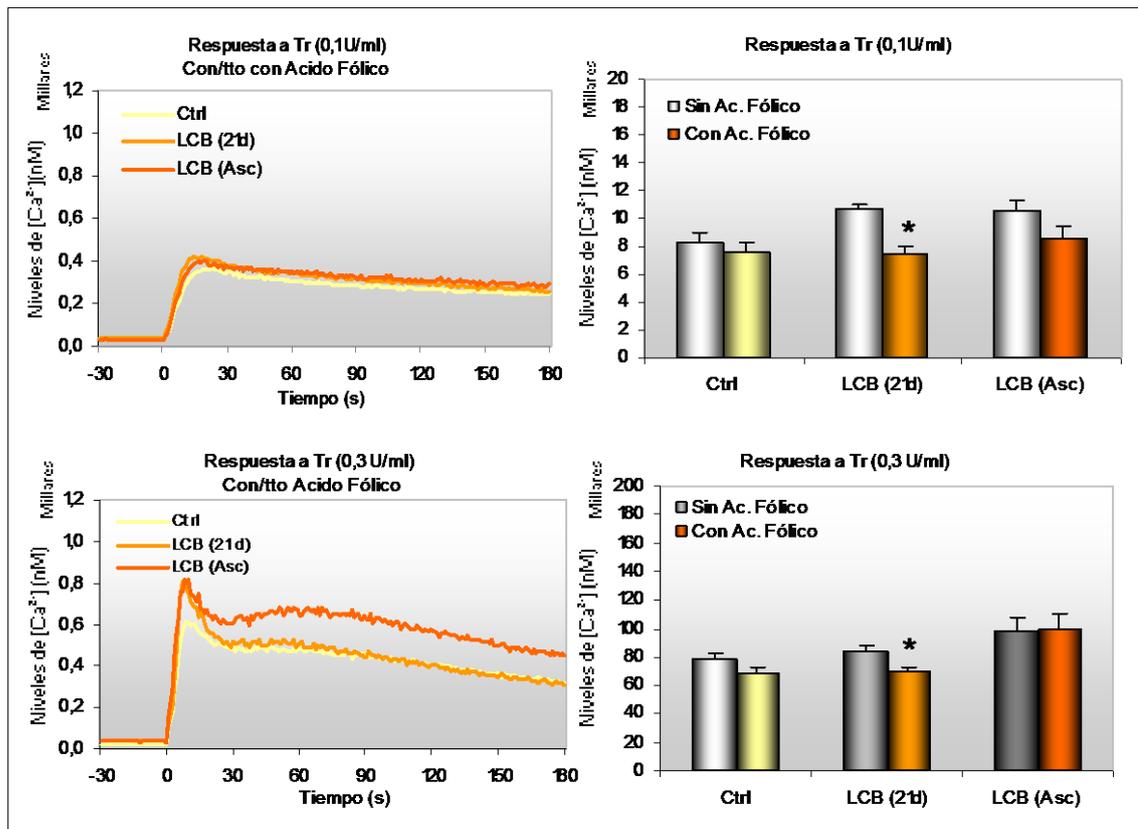


Figura 48: Efecto de la Tr (0,1 y 0,3 U/mL) sobre la entrada de Ca^{2+} intracelular, en presencia de Ca^{2+} extracelular, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0.05$ vs LCB (21d) sin/tto.

Tabla 35: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca^{2+} intracelular en respuesta a Tr (0,3 U/mL), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs LCB (21d) sin/tto.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin/tto Ac. Fólico	78366,3±3770,7 (n=8)	84107,6±4262,5 (n=12)	98268,5±9620,7 (n=7)
Con/tto Ac. Fólico	69038,6±3500,2 (n=7)	70498,8±1821,7 * (n=10)	99658±10541,8 (n=5)

5.3.4 NIVELES TOTALES DE Ca^{2+} PLAQUETARIO:

En respuesta a TG + Ionomicina

Para medir los niveles totales de Ca^{2+} intracelular almacenados en las diversas estructuras intraplaquetarias, se eliminó todo el Ca^{2+} extracelular presente (EGTA 200 μ M) y se estimuló su salida con taspigargina más ionomicina. Observamos que el tratamiento crónico con ácido fólico no cambia la respuesta de los animales con LCB, siendo ésta mayor que en el grupo control (Fig. 49). Estos resultados muestran que el tratamiento con ácido fólico no altera el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} en las plaquetas de los animales con LCB, sugiriendo que la Hcy no es responsable de esta alteración.

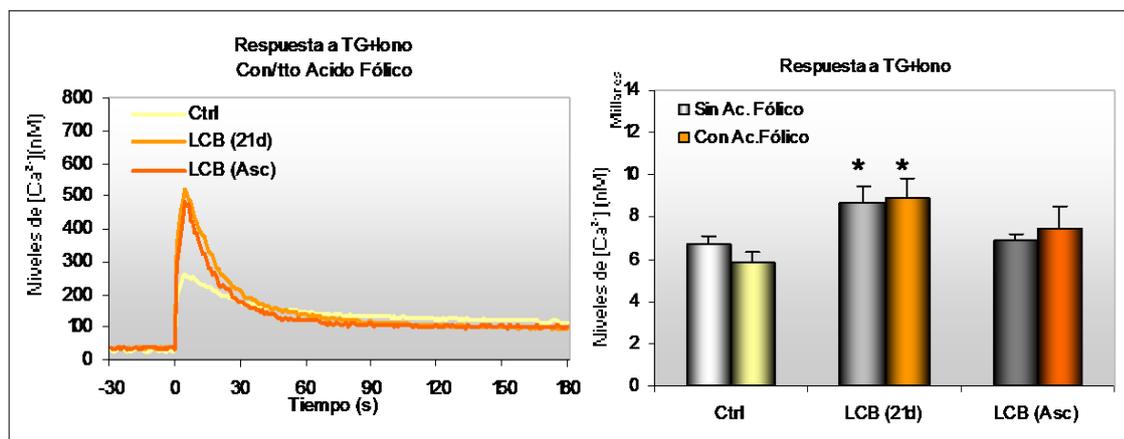


Figura 49: Efecto de la TG + Ionomicina sobre los niveles totales de Ca^{2+} intracelular, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl.

5.3.5 ENTRADA CAPACITATIVA DEL Ca^{2+} (ECC)

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la estimulación con TG da lugar a un aumento de Ca^{2+} intracelular, siendo mayor en plaquetas de ratas LCB con respecto al control. El tratamiento crónico con ácido fólico no mejora dicha respuesta en ratas cirróticas.

Posteriormente al adicionar Ca^{2+} al medio extracelular, se produce un gran aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la ECC. Este aumento de Ca^{2+} es mayor en controles que en ratas cirróticas. El tratamiento crónico con ácido fólico no mejora dicha respuesta en los animales de estudio.

5.4 PRODUCCIÓN DE ESPECIES ROS

En los animales tratados crónicamente con ácido fólico, podemos observar que los niveles de ROS producidos en animales cirróticos tras la estimulación con Tr está notablemente disminuida con respecto a su grupo sin tratamiento, siendo en animales LCB con ascitis significativa esta diferencia ($p < 0,05$) (Fig. 50, Tabla 36).

Respecto al efecto del tratamiento crónico del ácido fólico, sobre la producción de ROS en las plaquetas, tras ser estimuladas con ADP ($5 \mu\text{M}$) y H_2O_2 (1 mM), al igual que en los grupos sin tratamiento no se produjo una producción apreciable de ROS en ningún grupo experimental.

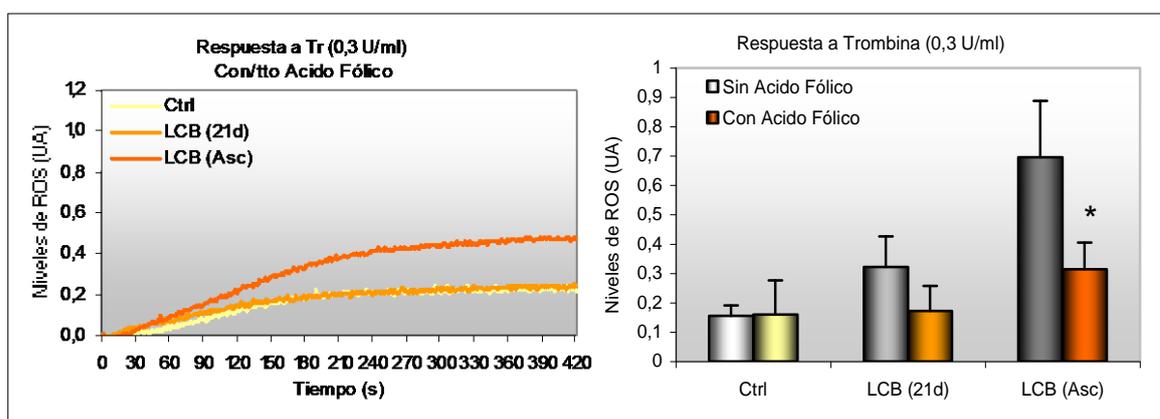


Figura 50: Efecto de la Tr (0,3 U/mL) sobre los niveles de ROS, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico, (420 s de registro ó 7 min). (*): $p < 0,05$ vs LCB (Asc) sin/tto.

También observamos que el ácido fólico fue capaz de disminuir de forma significativa ($p < 0,05$) la producción de ROS tras la estimulación con Hcy ($200 \mu\text{M}$) en los animales cirróticos (Fig. 51, Tabla 36).

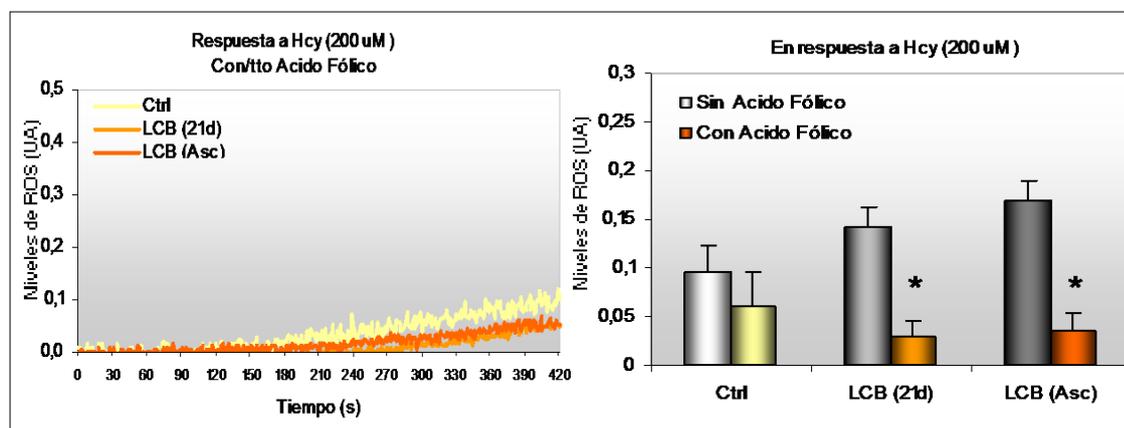


Figura 51: Efecto de la Hcy ($200 \mu\text{M}$) sobre los niveles de ROS, a la derecha, representación del área bajo la curva de dicha respuesta, en plaquetas de animales control, LCB de 21 días y con ascitis, con y sin tratamiento crónico con ácido fólico, (420 s de registro ó 7 min). (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo.

Tabla 36: Valores del área bajo la curva (expresado en UA) de los niveles de ROS en respuesta a H_2O_2 , trombina, ADP y Hcy, en animales control, LCB de 21 días y con ascitis, tratadas crónicamente con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo sin/tto (Tabla 17 y 30 ref. sin/tto).

Agonistas	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
H_2O_2 (1mM)	$0,5 \pm 0,1$ (n=10)	$0,5 \pm 0,1$ (n=13)	$0,5 \pm 0,1$ (n=7)
Tr (0,3 U/mL)	$0,1 \pm 0,1$ (n=8)	$0,2 \pm 0,1$ (n=7)	$0,3 \pm 0,1$ * (n=5)
ADP (5 μM)	$0,01 \pm 0$ (n=4)	$0,01 \pm 0$ (n=6)	$0,002 \pm 0$ (n=7)
Hcy (200 μM)	$0,1 \pm 0$ (n=6)	$0,03 \pm 0$ * (n=13)	$0,03 \pm 0$ * (n=8)

VI

SUMARIO DE RESULTADOS



1. Los animales con LCB presentan una mayor agregación plaquetaria in vitro, tanto si se expresa como porcentaje máximo o como duración de la respuesta. La presencia de ascitis, revierte esta alteración e incluso reduce notablemente la duración de la respuesta.

- **FACTORES INTRÍNSECOS:**

2. Basalmente, hay una mayor expresión del receptor de activación (P-selectina) en plaquetas de animales cirróticos (sin y con ascitis) que en las del grupo control. La estimulación con agonista (ADP) aumenta la expresión en todos los grupos, pero este aumento es mucho mayor en el grupo cirrótico sin ascitis.
3. Los niveles basales de Ca^{2+} son más altos en las plaquetas de los animales cirróticos (Fig. 4). En el grupo de cirrosis sin ascitis, la respuesta a los agonistas ADP y trombina produce un mayor aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} , estimado por la respuesta a taspigargina mas ionomicina es mayor (Fig. 5, 6 y 7 respectivamente). La ECC, está disminuida en las plaquetas de las ratas cirróticas y la aparición de ascitis altera aún más este proceso (Fig. 8).

Papel del NO: respuesta a L-NAME crónico

4. La inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME no mejora las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} citoplasmático en las plaquetas de los animales cirróticos (Fig. 11, 12 y 14).

Disminución de la disponibilidad de NO, tras el tratamiento agudo con BSO

5. Se observa que la reducción de los niveles de NO en la plaquetas, reduce basalmente la $[Ca^{2+}]_i$, normalizando los niveles de Ca^{2+} en el grupo de LCB (21 días) (Fig. 16). También observamos una reducción de los almacenes de Ca^{2+} , tanto en plaquetas de animales LCB (21 días) como en el grupo control. En la ECC, el BSO es capaz de disminuir aún más la entrada de Ca^{2+} a los almacenes en los animales LCB (21 días) (Fig. 19 y 20).
6. Basalmente no se observan diferencias en la producción de ROS, entre plaquetas de animales cirróticos con respecto al grupo control. Pero tras la estimulación con el agonista (trombina), las plaquetas de los animales cirróticos producen una mayor cantidad de ROS que su grupo control (Fig. 22).

- **FACTORES EXTRÍNSECOS:**

EFFECTO AGUDO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

7. La incubación con los ácidos desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC) no altera la sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina) encontrada en las plaquetas de animales LCB (21 días) (Fig. 24).
8. Los ácidos biliares DC y CDC son capaces de aumentar los niveles basales de Ca^{2+} intracelular tanto en plaquetas de animales cirróticos como en animales control (Fig. 25). La incubación con DC hace que disminuya la respuesta al agonista (trombina), por lo que a su vez también observamos una disminución de los almacenes de Ca^{2+} intracelular en animales cirróticos y controles (Fig. 26 y 27). La ECC también se ve doblemente disminuida en los tres grupos de estudio, tanto con el tratamiento con DC como con CDC (Fig. 29).

EFFECTO AGUDO DE LA HOMOCISTEÍNA (Hcy)

9. Tras la sobrecarga con L-metionina, tanto en animales cirróticos como en controles, vemos que los niveles de Hcy en plasma, son significativamente más altos en animales LCB con respecto a su grupo control (Fig. 31).
10. La incubación con Hcy a concentraciones crecientes (1, 25 y 100 μ M) aumenta la respuesta de agregación al ADP en controles y LCB (15 y 21 días); en cambio, en los animales con presencia de ascitis la Hcy no altera su respuesta (Fig. 32).
11. La incubación con la Hcy, no altera la sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina), ya encontrada en plaquetas de animales LCB (21 días) (Fig. 33).
12. La Hcy aumenta los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en el grupo control (10 y 25 μ M) y sin ascitis (25 μ M) (Fig. 34). Además, la Hcy (25 μ M) aumenta la respuesta al agonista (trombina) en estos dos grupos (Fig. 36). Sin embargo, no es capaz de alterar el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} intra- plaquetarios ni la ECC, en ninguno de los grupos de estudio (Fig. 37).
13. La Hcy (200 μ M) produce una mayor cantidad de ROS en el grupo cirrótico, siendo esta más significativa en el grupo con ascitis (Fig. 39).



EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ACIDO FÓLICO

14. El tratamiento con ácido fólico disminuye la respuesta de agregación plaquetaria, sobre todo en el grupo cirrótico, siendo este descenso mucho más pronunciado en ausencia de ascitis (con un 57,5 % de descenso) (Fig. 40 y 42) (Tabla L, anexos).
15. El tratamiento crónico con ácido fólico no altera la expresión basal de la P-selectina, pero disminuye la respuesta a ADP en todos los grupos experimentales (Fig. 43).
16. Tras el tratamiento crónico con ácido fólico, ni los niveles basales de Ca^{2+} intracelular, tamaño de los almacenes de Ca^{2+} , ni la ECC, se normalizan en los animales de estudio. Pero sí produce una disminución en cuanto a la respuesta a agonista (trombina) en el grupo de cirrosis sin ascitis (Fig. 47).
17. El tratamiento crónico con ácido fólico disminuye la excesiva producción de ROS en respuesta a trombina u Hcy en las plaquetas de los animales cirróticos, normalizándola (Fig. 49 y 50).

Conclusiones:

1. Los animales con cirrosis biliar experimental por ligadura del conducto biliar (LCB), sin presencia de ascitis, presentan una mayor agregación plaquetaria. Esta alteración está relacionada con una mayor movilización del Ca^{2+} intracelular, pero con una menor ECC. Sumado a ello, presentan sobreexpresión del receptor de activación (P-selectina) y una mayor producción de ROS. La presencia de ascitis revierte parte de estas alteraciones, llegando incluso a producir una hipoagregación, que se acompaña de una gran disminución de la ECC y una excesiva producción de ROS.
2. El óxido nítrico (NO) tiene un papel en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en las plaquetas de animales LCB, ya que su ausencia hace que disminuya aún más la ECC.
3. Un aumento plasmático de ácidos biliares, como el desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC), podría explicar en parte los niveles elevados de $[Ca^{2+}]_c$ plaquetario basal y la menor ECC en animales con cirrosis biliar experimental. Sin embargo, estos ácidos biliares no están relacionados con la sobreexpresión de la P-selectina encontrada en los animales cirróticos sin ascitis.
4. El tratamiento crónico con ácido fólico puede ser efectivo en la cirrosis biliar, en una fase pre-ascítica, ya que revierte la hiperagregación plaquetaria y produce una menor expresión de la P-selectina en respuesta a agonista. Esto se acompaña de una normalización en la producción de ROS y una menor liberación de Ca^{2+} de los almacenes, aunque sin cambios en la ECC.

-
5. Diversos factores plasmáticos (Hcy, NO, ácidos biliares) pueden contribuir a la hiper- excitabilidad plaquetaria de la cirrosis biliar experimental sin ascitis, mediante un aumento excesivo de los niveles de Ca^{2+} y/o producción de ROS. La aparición de ascitis reduce la duración de la respuesta de agregación, lo que puede ser explicado por la mayor producción de ROS.

VII

DISCUSIONES



La cirrosis hepática es una enfermedad que se caracteriza por una distorsión irreversible de la arquitectura hepática y una elevada acumulación de fibrosis, lo que conduce a un fallo funcional a nivel sistémico. Entre las profundas alteraciones fisiológicas, podemos incluir el desarrollo de una circulación hiperdinámica (caracterizada por un incremento del gasto cardíaco y una disminución en la resistencia vascular periférica), cardiomiopatía, síndrome hepatopulmonar, coagulopatía y disfunción renal con retención de agua y sal lo que genera ascitis e hiponatremia (García-Estañ y cols., 2002).

La hemostasia en los pacientes con cirrosis está influenciada por variables múltiples, opuestas y cambiantes, que pueden favorecer tanto la aparición de episodios de sangrado, como de estados de hipercoagulación (García-Tevijano y cols., 2001). Las anormalidades plaquetarias descritas en la cirrosis, incluyen no solo trombocitopenia, sino también defectos en la agregación (Forrest y cols., 1996), ya sea por una hiper o hiporrespuesta. Aunque no se sabe con certeza qué mecanismos causan el inicio y el mantenimiento del trastorno hemostático en la cirrosis, varios estudios sugieren que los altos niveles de homocisteína (Hcy) en el plasma puede ayudar a ser un inductor efectivo de la fibrogénesis del hígado ya que interfiere con la estructura y la función de varias proteínas (N-homocisteinilación) al inducir la expresión de procolágeno tipo I (Torres y cols., 1999; García-Tevijano y cols., 2001). Esto último altera además el metabolismo de los ácidos grasos del plasma y membranas lipídicas, conduciendo a cambios en los receptores de las membranas (Durand y cols., 1997). A su vez, la Hcy al ser fácilmente oxidada en el plasma, principalmente como consecuencia de su auto-oxidación, va a generar aniones superóxido (O_2^-) y peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) (Okatani y cols., 2001). Éstas moléculas producen estrés oxidativo, daño endotelial y procesos de inflamación que va a contribuir a la activación plaquetaria (Luo y cols., 2005; Durand y cols., 1996).

La fisiopatología de todas estas alteraciones hemostáticas es un área de gran interés, puesto que su conocimiento puede contribuir a enfocar mejor el tratamiento en los pacientes con cirrosis hepática. Así, se ha descrito una hiper-estimulación plaquetaria en pacientes con cirrosis biliar primaria, relacionándola con la mayor tendencia de trombosis portal en este tipo de cirrosis hepática (Ben-Ari y cols., 1997; Caldwell y cols., 2006). Un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) inicia y modula diversos procesos celulares, además de ser el mecanismo esencial para la activación plaquetaria (Rosado y cols., 2006). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las plaquetas de animales con cirrosis biliar experimental (sin ascitis), presentan alteraciones en la movilidad del calcio intracitoplasmático, compatibles con una mayor recaptación de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (Iyú, 2005). El objetivo de este trabajo es estudiar, desde el inicio de la colestasis hepática hasta la aparición de ascitis, el papel de las alteraciones del Ca^{2+} intracitoplasmático en la función plaquetaria y su regulación por factores extrínsecos o plasmáticos como la Hcy, ácidos biliares, óxido nítrico y estrés oxidativo. El tratamiento crónico con ácido fólico en el agua de bebida ha permitido profundizar en el papel de la Hcy, ya que favorece su degradación, vía hepática, previniendo incrementos en sus niveles plasmáticos.

En este estudio, se ha utilizado el modelo de cirrosis hepática por ligadura del conducto biliar (LCB), caracterizado en estudios anteriores de nuestro laboratorio, y que es capaz de inducir una colestasis inicial que evoluciona a una cirrosis hepática, que en su etapa final se descompensa y produce ascitis. Estos animales presentan las típicas alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática, con hepatomegalia y esplenomegalia. El peso del bazo se utilizó como una estimación de la hipertensión portal (cuyo aumento depende a su vez del grado de daño hepático). Nuestros resultados muestran que el bazo va aumentando de peso conforme avanza el daño hepático, lo que podría contribuir a la trombopenia que hemos observado en los animales con ascitis, ya que este aumento de peso se produce, según otros estudios, a costa de una retención de plaquetas y hematíes en el bazo (Peck-Radosavljevic, 2007). Los animales con LCB presentan, al igual que los pacientes, dos estadios de la enfermedad claramente diferenciados, cirrosis compensada o sin presencia de ascitis y cirrosis descompensada o con presencia de ascitis. El número de plaquetas así como la función de las mismas dependerá del grado de cirrosis en que se encuentren los sujetos de estudio. En nuestro caso, hemos encontrado que en una primera etapa (colestasis o cirrosis sin ascitis), existe hiper-agregabilidad plaquetaria con normocitopenia y en una segunda etapa, la aparición de ascitis produce hipogregabilidad que se suele acompañar de trombocitopenia. Así, la presencia de ascitis se acompaña de un deterioro importante de la respuesta de agregación plaquetaria, lo que puede ser debido a un fallo de los mecanismos de compensación estimulados en la primera etapa.

Colestasis (LCB 15 días) y cirrosis sin ascitis (LCB 21 días)

En los animales con LCB, la respuesta de agregación plaquetaria va aumentando a medida que va progresando la enfermedad, llegando casi a doblar su valor a los 21 días. Estos datos se asemejan a los hallados por Watanabe y colaboradores (1998), en pacientes cirróticos. Ellos encontraron un cambio en la composición de ácidos grasos de la membrana plaquetaria de estos pacientes, de manera que el colesterol y los fosfolípidos aumentaban, mientras que la fosfatidil serina y el fosfatidil inositol, factores importantes para la activación plaquetaria, estaban reducidos.

La fisiopatología de la activación plaquetaria en la cirrosis no tiene un claro mecanismo y varía dependiendo de la etiología de la enfermedad. La enfermedad hepática colestática tiende a producir un estado de hiperagregabilidad, existiendo un 40 % de riesgo de padecer trombosis portal venosa cuando se realiza el trasplante hepático (Shannon y cols., 1995; Witters y cols., 2008), que se correlaciona con un incremento en la expresión de receptores de adhesión, como el CD42d (glicoproteína que se une al vWF), sugiriendo una preactivación plaquetaria. Además, la trombina es un factor clave en la cascada de la coagulación y a través de receptores PAR1 y 4 actúa como un potente activador. Así, es posible que un aumento de la trombina in vivo pueda contribuir, en parte, en la activación plaquetaria, como sugiere el hallazgo de una correlación entre los niveles de plasma de fragmentos de protrombina F1+2 y la excreción urinaria del TXB2



en este tipo de cirrosis (Davi y cols., 1998). En nuestros experimentos, este estado de hiperagregabilidad, se acompaña de un incremento de los niveles basales de Ca^{2+} intraplaquetario, así como de una mayor liberación intracelular de Ca^{2+} desde los depósitos tras la estimulación con agonistas, lo que puede explicar también parcialmente esta hiper-respuesta. En cuanto a la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), que se produce al vaciar los almacenes de Ca^{2+} , fue menor en las plaquetas de los animales con LCB, con respecto al grupo control. Esta menor ECC no limita la respuesta de agregación en la colestasis o cirrosis compensada, posiblemente porque existen otros mecanismos que compensan la menor entrada de Ca^{2+} .

En nuestro estudio, hemos observado que existe un aumento en la expresión de la P-selectina en la superficie de las plaquetas de ratas con LCB de 21 tras ser estimuladas con ADP. Estudios por otros autores han demostrado que la P-selectina soluble (sPs), está elevada en el plasma en pacientes con una severa enfermedad hepática, siendo un marcador *in vivo* de la activación plaquetaria, llevando así a un mayor estado de agregación (Varderehli y cols., 2007).

Cirrosis colestática con presencia de ascitis (LCB Asc)

La presencia de ascitis se acompaña de un deterioro en la función plaquetaria, con una disminución en la duración de la respuesta de agregación, a pesar de que la respuesta máxima no se altera. En cuanto a la ECC, la depleción de los almacenes con TG, provocó claramente una menor ECC en ratas LCB con ascitis con respecto a su control. Estos resultados se confirmaron al analizar el apagamiento de la fluorescencia del fura-2AM, mediado por la entrada del Mn^{2+} (Fig. 10), un ión que utiliza los mismos canales operados por almacenes (SOC) que el Ca^{+2} (Atucha y cols., 2007). Estos experimentos confirmaron los resultados obtenidos con la TG, indicando que la ECC, secundaria a la inhibición de la SERCA, está reducida en plaquetas de ratas cirróticas. Esta menor ECC puede ser responsable de la disminución en la respuesta de agregación, posiblemente porque no puede ser compensada por otros mecanismos como ocurre en la etapa pre-ascítica.

La expresión de la P-selectina, basalmente también está aumentada como en el grupo sin ascitis, sin embargo su expresión no aumenta tras ser estimuladas con ADP, lo que sugiere que las plaquetas están basalmente en un estado de estimulación máxima.

El incremento en la producción de radicales libres ha sido implicado en varias condiciones, las cuales resultan en un aumento en el daño hepático y fibrosis. Bajo condiciones normales, del 1 al 4% del oxígeno (O_2) que llega a las células se convierte en especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden ser fácilmente neutralizadas por el sistema antioxidante en las células y en las mitocondrias (Díaz y cols., 2010). El estrés oxidativo es el desequilibrio entre las ROS y los antioxidantes, de manera que tanto el incremento de la producción de radicales libres como la disminución de antioxidantes,

puede resultar en el aumento de iones superóxido. En pacientes con cirrosis avanzada, se ha visto que la producción de radicales libres, está correlacionado con el número de neutrófilos en la sangre y activa el sistema monocito/macrófago (Feng Chen y cols., 1997). El anión superóxido actúa como un agente pro-inflamatorio al regular neutrófilos, induce la liberación de agentes quimiotácticos y mediadores proinflamatorios como el TNF- α y la IL-1, genera daños a los ácidos nucleicos e inicia la peroxidación lipídica (Díaz y cols., 2010). Nuestros datos, muestran que en animales LCB con ascitis las plaquetas responden con un mayor aumento de ROS tras la estimulación con un agonista como la trombina (Fig. 22). Por lo tanto las plaquetas de animales cirróticos también son una fuente de ROS, que podría alterar la ECC de Ca^{2+} , dependiendo de su concentración. Rosado y cols. (2006) mostraron que a bajas concentraciones de H_2O_2 (<100 μ M), los ROS pueden actuar como segundos mensajeros en la activación de la ECC. Ellos vieron que existía una correlación positiva entre la liberación y la entrada de Ca^{2+} inducida por H_2O_2 , que induciría a una reorganización del citoesqueleto de actina, similar a la observada tras la estimulación con agonistas fisiológicos. Por el contrario, dicha despolimerización no se observó tras el tratamiento con altas concentraciones de H_2O_2 (Rosado y cols., 2006). Por lo tanto, el aumento de ROS en las plaquetas de los animales con cirrosis y ascitis podría explicar, en parte la menor ECC observada en nuestros experimentos.

EFEECTO DE LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) CON L-NAME

El óxido nítrico (NO) sintetizado por las plaquetas y por el endotelio inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria, ejerciendo su acción a través un aumento del GMP cíclico (Radomsky & Moncada, 1993); el cual, a su vez, conduce a una disminución de la disponibilidad de Ca^{2+} en las plaquetas (Geiger y cols., 1992). La expresión de la P-selectina y la activación del complejo glicoprotéico IIb-IIIa, que se producen tras la activación plaquetaria por agonistas, son también inhibidos por el NO (Michelson y cols., 1996).

Hay que destacar que Lantoiné y colaboradores, han demostrado que el Ca^{2+} citosólico, a su vez, participa en la regulación de la síntesis del NO (Jeyachristy y cols., 2008). Y el NO derivado de las plaquetas no solo modula la activación plaquetaria a los agonistas fuertes y débiles, sino que además puede inhibir notablemente el reclutamiento de las plaquetas para la formación del trombo hemostático (Freedman y cols., 1997). Esto también ha sido demostrado en un modelo de daño glomerular inducido por endotoxinas, donde el NO inhibe la agregación plaquetaria previniendo la trombosis (Stamler y cols., 1989).

Los niveles basales de NO y NOS en plaquetas no estimuladas de pacientes con cirrosis son mayores comparados con plaquetas de sujetos normales (Jeyachristy y cols., 2008). Se ha sugerido que el NO inhibe la ECC en plaquetas humanas por activación del relleno de los almacenes (Trepakova y cols., 1999). Nuestro grupo de trabajo, demostró, que el tratamiento crónico con L-NAME (40 mg/kg/día) en ratas controles producía una



hipertensión arterial sistémica por reducción en la producción de NO, con alteración de la regulación de los niveles de calcio plaquetario, elevando los niveles basales y alterando la entrada y movilización de calcio citosólico. Esto puede deberse a los efectos directos o indirectos de la pérdida de síntesis del NO en las plaquetas o en otros tejidos (Iyu y cols., 2004).

En nuestro modelo experimental de cirrosis por LCB, ya basalmente las plaquetas presentan unos niveles elevados de Ca^{2+} intracelular, y el tratamiento crónico con L-NAME no produjo cambios en éste aspecto. Sin embargo, se esperaba que la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME pudiera modificar el tamaño de los almacenes de Ca^{2+} o la ECC. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con L-NAME no produce cambios significativos en estos parámetros. Esto último podría indicar que el NO no es el responsable de las alteraciones encontradas, que la inhibición de la síntesis de NO no elimina todas las fuentes de NO o que se ponen en marcha mecanismos compensadores tras la inhibición crónica. Respecto a esta última posibilidad, Albornoz y colaboradores encontraron que las plaquetas de ratas sometidas a la LCB, al ser tratadas con L-NNA (para inhibir la síntesis de NO) no alteraban su respuesta de agregación, aunque el tiempo de sangrado se vio parcialmente normalizado (Albornoz y cols., 1999). Éste último efecto se pudo deber a otros factores diferentes a las plaquetas, ya que tanto el tiempo de sangrado como la presencia de ascitis introducen otros aspectos moduladores.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO AGUDO CON LA BSO

En condiciones fisiológicas los grupos sulfidrilo reaccionan con el NO en presencia de oxígeno para producir S-nitrotioles los cuales son almacenados en las células como S-nitroglutathion.

Cuando la síntesis de NO es interrumpida, por diferentes causas, estos S-nitrotioles se descomponen poco a poco para aumentar el NO (Sogo y cols., 2000). Por ello, la inhibición crónica de NO puede que no sea suficiente para eliminar estos almacenes y que quede una producción de NO residual en las plaquetas a partir de estos almacenes, que sea suficiente para enmascarar la falta de síntesis (producida por el tratamiento con L-NAME). La Butionina Sulfoximina (BSO) es una sustancia que inhibe la síntesis de la enzima gamma-glutamylcisteína (γ -GCS) y reduce al glutatión (GSH) y niveles de enzimas antioxidantes (como la vit C). Zhou y cols., demostraron que la BSO inducía hipertensión debido a la reducción de la biodisponibilidad de NO producido por la ROS, al formarse peroxinitrito (ONOO^-), que impide que ese NO secuestrado actué normalmente (Zhou y cols., 2002).

Así que para ver el papel integral del NO, además del tratamiento con L-NAME, se ha realizado simultáneamente el vaciamiento de los almacenes de NO plaquetario, mediante un tratamiento agudo de las plaquetas con BSO. L-NAME crónico + BSO agudo, provocó una disminución en la liberación (Fig. 16) y en los niveles totales de Ca^{2+}

(Fig. 18), y en animales LCB con ascitis no se observaron ningunas diferencias con respecto al control. Es decir este tratamiento combinado normaliza el calcio basal y la entrada de calcio extracelular que estaban aumentados en ratas LCB con ascitis sin tratar.

Pero de forma más llamativa, tras el tratamiento combinado de L-NAME y BSO, los niveles basales y los niveles totales de Ca^{2+} disminuyen en ratas LCB de 21d comparadas con las plaquetas sin tratamiento con BSO. Además, la respuesta a TG también se halla disminuida al igual que su ECC (Fig. 19). Por lo tanto una ausencia total de NO provoca una menor respuesta a los agonistas, y también es responsable de una disminución en la movilización de Ca^{2+} celular. Por lo tanto podemos decir que el NO estaría almacenado en los depósitos celulares plaquetarios y que de alguna forma va a contribuir para mantener los niveles de Ca^{2+} celular plaquetario.

En cuanto a la expresión de la P-selectina, el tratamiento de la BSO no produjo ninguna alteración en cuanto a su expresión en ninguno de los grupos de estudio. Por lo tanto el estado de sobre expresión en respuesta a ADP, en animales LCB de 21 días estaría solventado por otro tipo de mecanismos que mantengan su estado de activación. Puesto que el NO no explica totalmente las alteraciones en la función plaquetaria de animales con LCB, también se estudió el papel de otros factores plasmáticos que están incrementados en la cirrosis hepática:

EFEECTO DE LA HOMOCISTEÍNA vs TRATAMIENTO CRÓNICO CON ÁCIDO FÓLICO

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido sulfurado que viene del metabolismo de la metionina (adquirida en la dieta). El incremento en las concentraciones en el plasma está asociado con un incremento en el riesgo de la arterioesclerosis y trombosis arterial (Luo y cols., 2006). La hiperhomocisteinemia (HHcy) puede ser causada por una deficiencia enzimática como la cistationina β -sintasa (CBS) o por agentes farmacéuticos. Este incremento promueve el daño endotelial, hiperactividad plaquetaria y la producción anormal de factores de coagulación que llevan al desarrollo de tromboembolismo plaquetario a nivel carotídeo, coronario y sistema vascular periférico (Durand y cols., 1996; Luo y cols., 2006).

EFFECTOS EN LA CIRROSIS COLESTÁTICA EN AUSENCIA ASCITIS (LCB 21 días)

En la agregación:

En nuestras ratas control y con LCB de 15 y 21 días, y de forma similar, podemos observar (Fig. 32, Tabla 26) que el área de agregación se ve aumentada cuando las



plaquetas son incubadas con Hcy a concentraciones crecientes. Por lo tanto diremos que la Hcy potencia la actividad agregante del ADP en estos grupos experimentales. En las ratas control y con LCB (15 y 21 días) con tratamiento crónico de ácido fólico observamos que la Hcy aguda (a diferentes concentraciones) no pierde su efecto potenciador de la agregación, pero su efecto es menor que en ratas no tratadas y además en ningún caso se normaliza la agregación. Nuestros resultados muestran claramente que el tratamiento con ácido fólico tiene un efecto anti-agregante muy importante y este efecto fue mayor en los animales con LCB (15 y 21 días) con un porcentaje de descenso de un 57,5 % para el área de agregación con respecto a los animales sin tratamiento (Fig. 42, Tabla 32); sin embargo es menos apreciable esta diferencia al tomar en cuenta la agregación máxima siendo significativo solo para LCB de 15 días con un 20,5 % de descenso (Tabla L, anexos). Esto nos indica, que la Hcy tiene un papel fisiológico en la agregación plaquetaria, que sería fundamental para que las plaquetas funcionen correctamente. Puesto que el efecto del ácido fólico es mayor en ratas LCB, podemos pensar que la Hcy tiene un papel mayor en la agregación en la cirrosis colestática compensada que en condiciones normales.

Está bien documentado que la HHcy también está presente en pacientes con cirrosis, ya sea adquirida por virus, alcohólica, química (CCl_4) o por interrupción del flujo biliar. Es probable que la Hcy sea una de las causas que contribuya a esta patogénesis de la trombosis por una variedad de mecanismos dependientes de la enfermedad (García-tevijano y cols., 2001; Riba y cols., 2004). Por lo tanto otro factor que pueda producir la hiperagregabilidad, en nuestro estudio, son los niveles elevados de Hcy. En el modelo de LCB en ratas, se ha descrito que a la segunda semana e inicios de la tercera, los niveles de Hcy en el plasma son elevados, pero luego a la cuarta semana vuelve a retornar a su nivel normal (Ebrahimkhani y cols., 2005). En base a estos datos, nosotros atribuimos que el aumento en la agregación en ratas a los 15 y 21 días después de la ligadura del conducto biliar, podría ser debido a una HHcy. De hecho para asegurarnos de ello, realizamos la medición plasmáticas de la Hcy en animales control y LCB, con una previa sobrecarga con L-metionina, debido a que la medición de forma basal no revelaba ninguna diferencia entre los grupos de estudio, ya que los niveles compensatorios para mantener los niveles de Hcy resultaban ser muy variables, es por ello que una sobrecarga nos ayudó a ver la alteración de forma más clara. En la figura 31, podemos observar que los animales LCB presentan mayores niveles de Hcy que sus controles, por lo tanto, tienen alterado el metabolismo de la Hcy. Un estudio del 2005 revela que ratas LCB también presentaban dicha alteración, sus niveles de Hcy en el plasma, eran más altos a los 15 días después de la ligadura del conducto biliar y también eran acompañados por incremento en tejido hepático de la S-adenosil-homocisteina (SAH) y la S-adenosil-metionina (SAM), moléculas intermedias para la formación de Hcy. Además que tras el tratamiento con L-NAME, los niveles de SAH y SAM disminuían, junto con el de Hcy y metionina, lo que confirmaría que la sobreproducción de NO también puede contribuir a la elevación de los niveles de Hcy en el plasma (Ebrahimkhani y cols., 2005). También se ha visto que el NO y el estrés oxidativo puede inactivar a la metionina sintasa (MS), el cual participa en la

remetilación de la Hcy. Pero como ya habíamos mencionado anteriormente, el NO es capaz de inhibir la activación plaquetaria, incluso cuando reacciona con la Hcy, para formar S-nitroso-Hcy, el cual tiene algunas propiedades del NO; esto representa un mecanismo protector contra las consecuencias adversas de una elevación de la Hcy. Sin embargo, altas y prolongadas concentraciones de Hcy resulta en un daño en la producción de NO, reduciendo su actividad por degradación oxidativa y por inhibición de la glutatión peroxidasa (Mohan y cols., 2008).

En la cirrosis existe una deficiencia de ácido fólico, lo que se piensa que es debido al daño hepático que puede reducir la capacidad de almacenar el ácido fólico, o bien estar relacionado con una mala absorción. La deficiencia de ácido fólico produce un aumento en la actividad del factor tisular (FT) por estimulación de endotoxinas derivadas de los macrófagos, contribuye también a la activación pro-coagulante (PCA). La superficie celular plaquetaria se hace más apta para la actividad catalítica del FT o mejora la capacidad de unión del FT una vez que ha sido expresado sobre la superficie celular, aumentando así la capacidad trombogénica de las plaquetas (Durand y cols., 1996; Doi y cols., 2006). Sumado a ello, la deficiencia vitamínica incrementa la actividad plaquetaria en respuesta al ADP y trombina por vía del ácido araquidónico (AA) que a su vez aumenta la actividad del tromboxano (TXA₂), que es un pro-agregante y vasoconstrictor. En estudios *in vivo*, también se vio que la deficiencia de ácido fólico hace que disminuya la actividad antitrombótica derivada de endotelio y las prostaglandinas (Durand y cols., 1997; Besen y cols., 2003; Signorello y cols., 2002).

Así, hay un gran número de estudios sobre el efecto inhibitor del ácido fólico en la función plaquetaria y la existencia de niveles plasmáticos disminuidos en la enfermedad hepática. Estos datos nos indican que una dieta suplementada con ácido fólico puede mejorar la función plaquetaria en cirrosis, disminuyendo la agregabilidad. Nuestros datos vuelven a confirmar el efecto de esta vitamina en la función plaquetaria (Fig. 40 y 41). Sin embargo, en los pacientes cirróticos, esta hipoagregabilidad producida por el tratamiento también podría potenciar otro tipo de patología, es decir que se prolongue el tiempo de sangrado y un mayor peligro de hemorragia digestiva por varices debidas a la hipertensión portal. Por ello, es importante tener en cuenta en los pacientes con cirrosis hepática, los efectos colaterales del suplemento con vitaminas (en este caso el ácido fólico) en la función plaquetaria (Klipstein y col., 1965; Durand y cols., 1996; Durand y cols., 1997; Ebbesen y cols., 2003; Ebbesen y cols., 2004; McCarty, 2007).

En la homeostasis del Ca²⁺:

Cómo la Hcy puede operar, o cuáles son los mecanismos moleculares que van a estimular la activación aún no están claros, es por ello que nosotros analizamos el papel de la homeostasis del calcio intracelular, ya que este ión es esencial para la activación plaquetaria. La activación de las plaquetas por la mayoría de los agonistas, probablemente por todos, está acompañada por un aumento de la concentración de Ca²⁺ libre citoplasmático que resulta, no solamente de la redistribución del calcio almacenado en las



mencionadas estructuras, sino también de la difusión de Ca^{2+} extracelular hacia el interior de la célula a través de canales específicos para este catión. Aunque la magnitud y duración de las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la activación aumenten en presencia de Ca^{2+} extracelular, los mecanismos por los cuales se genera la entrada de Ca^{2+} continúan sin esclarecer (Woitas y cols., 2002).

Basalmente, la Hcy aumentó de manera significativa las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, tanto en controles como en LCB de 21 días (Fig. 34). Nuestros resultados indican que en respuesta al agonista trombina (0,3 U/mL) se produce una mayor liberación de Ca^{2+} desde los depósitos internos en las plaquetas de ratas sometidas a la LCB de 21 días, pero la Hcy no produjo ningún cambio en dicha liberación de Ca^{2+} . Los mecanismos responsables para esta alteración no son claros, es posible que sea a una mayor estimulación en la síntesis del IP_3 o por una mayor afinidad catalítica de la PLC, o un aumento de la afinidad del receptor IP_3 hacia el IP_3 . Además otros trabajos demuestran que la prostaciclina y el NO están aumentados en la cirrosis hepática y por lo tanto son capaces de inhibir la actividad del receptor IP_3 al promover su fosforilación y por lo tanto disminuir su afinidad hacia el IP_3 o bien que las plaquetas de las LCB presenten un aumento de resistencia de este receptor a la desensibilización. Otros artículos indican que las concentraciones de Ca^{2+} en los depósitos internos también participan en la regulación de la afinidad del IP_3 (Iyú, 2005). En nuestro trabajo, cuando inducimos el vaciamiento de los depósitos internos, tratando a las plaquetas con taspigargina e ionomicina (para ver el tamaño de los almacenes), encontramos que la cantidad de Ca^{2+} acumulado en los depósitos internos en las LCB de 21 días sin y con tratamiento con ácido fólico es significativamente mayor que sus controles (Fig. 48). Por lo tanto nosotros podemos explicar que esta mayor respuesta a la trombina por las LCB es debida a que éstas acumulan más Ca^{2+} en sus depósitos intracelulares, lo que podría estar ocasionando la mayor liberación de Ca^{2+} .

Por otro lado, no se observó ningún efecto de la Hcy en la liberación de Ca^{2+} intracelular, es decir que este aminoácido no es un factor que altere de forma aguda la liberación del Ca^{2+} en respuesta a trombina. Sin embargo, vemos una disminución significativa en la liberación del Ca^{2+} en ratas control tratadas crónicamente con ácido fólico con respecto a las sin tratar, y en la figura 45 y tabla M (anexos), vemos en general que hay una tendencia a disminuir esta liberación en las ratas LCB aunque no de una manera significativa en animales LCB. El mecanismo por el cual actúa el ácido fólico modificando la respuesta a trombina en ausencia de calcio extracelular no está claro. Por referencias bibliográficas sabemos que el ácido fólico disminuye los efectos producidos por la Hcy, por lo tanto asumimos que esta vitamina puede actuar por la misma vía que actúa la Hcy pero en sentido contrario. Es decir, inhibiendo la liberación de calcio desde los almacenes al medio intracelular ya sea inhibiendo la IP_3 o segundos mensajeros, contribuyendo a una menor producción de ácido araquidónico (AA) y por lo tanto de tromboxano (TXA_2). Otra acción descrita para la Hcy que podría ser inhibida por el ácido fólico es la inhibición de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Leoncini y cols., 2003).

Cuando las plaquetas son estimuladas con trombina en presencia de Ca^{2+} extracelular (1 mM) la señal de Ca^{2+} es mayor que en ausencia de calcio. En esta entrada de Ca^{2+} extracelular estimulada por agonista, no encontramos ninguna diferencia significativa entre LCB y controles ya sea con o sin tratamiento con ácido fólico (Fig. 47 A y B). Trabajos anteriores al nuestro encontraron diferencias a concentraciones bajas de trombina, a dosis similares a las que en las plaquetas se pueden encontrar en los vasos sanguíneos de manera que la activación de las plaquetas se da de forma más fácil. A dosis altas (como en nuestro experimento: 0,3 U/ml) no vimos diferencias en la entrada de Ca^{2+} . Posiblemente como el Ca^{2+} citosólico es un regulador importante de las bombas ATPasas de Ca^{2+} , elevadas dosis de trombina pueden producir elevados aumentos de Ca^{2+} que a su vez produzcan una gran activación de las bombas que eliminan Ca^{2+} al exterior celular (PMCA) y de las que bombean Ca^{2+} al interior de los depósitos internos (SERCA), produciendo un aumento neto de Ca^{2+} . Además el propio Ca^{2+} puede inhibir el flujo de Ca^{2+} a través de los canales que permiten la ECC (Ma y col., 2001; Malli y cols., 2005; Iyu, 2005). Por ello, nuestros resultados no descartan que a dosis más bajas, la respuesta a trombina en presencia de calcio extracelular esté modificada tras el tratamiento con ácido fólico.

En cuanto al efecto agudo con Hcy (10 y 25 μM), en la respuesta a trombina (Fig. 36), observamos que existe una tendencia a un aumento de la entrada de Ca^{2+} extracelular en controles y en LCB de 21 días, sin embargo solo encontramos una diferencia significativa en las LCB de 21 días sin tratar con respecto a su control cisteína, en la dosis de Hcy (25 μM). El mecanismo por el cual podría actuar, es estimulando la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) e inhibiendo la salida de Ca^{2+} al deplecionar el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Ebbesen y cols., 2003; Leoncini y cols., 2003; Matte y cols., 2006).

Al igual que en la liberación de Ca^{2+} intracelular, en la entrada de Ca^{2+} también vemos diferencias significativas al comparar el efecto de la trombina entre controles tratadas con las sin tratar crónicamente con ácido fólico. Existe una disminución en la entrada de calcio extracelular producido por la trombina tras el tratamiento crónico con ácido fólico. Aunque en ratas LCB existe una tendencia a una respuesta menor, las diferencias no fueron significativas. Esto se puede deber a múltiples factores y será necesario confirmar esta tendencia aumentando el número de animales experimentales.

Como ya habíamos mencionado antes, el mayor flujo de Ca^{2+} en las plaquetas se produce mediante entrada capacitativa (ECC). Estudios previos en nuestro laboratorio han encontrado una alteración en la ECC en plaquetas de ratas LCB a los 21 días. El inhibidor de Ca^{2+} ATPasa (SERCA), la taspigargina (Thastrup y cols., 1990), da lugar a la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol que causa el vaciamiento de los depósitos, estimulando la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática que permiten la ECC (Putney, y cols., 1999; Berridge y cols., 1995). En nuestros experimentos, la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares causada por la taspigargina, es mayor en el grupo con LCB que en el control, mostrando diferencias significativas, las ratas LCB de 21 días ya sea con o sin tratamiento crónico con ácido fólico. Esto indicaría mayor acumulación de Ca^{2+} en los



depósitos internos en el grupo LCB. Al estimular las plaquetas con Ca^{2+} (0,5 mM) para rellenar sus almacenes, las ratas LCB presentan niveles de Ca^{2+} intracelular menor que los controles (Fig. 8). Como ya habíamos mencionado antes, esto se puede deber a una menor entrada y/o una mayor salida de Ca^{2+} al espacio extracelular producida por la PMCA o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

El efecto de la Hcy en las plaquetas en la movilización del calcio en plaquetas se conoce poco. Posiblemente el mayor efecto en la agregación no esté a nivel de una estimulación específica de los receptores de Ca^{2+} , sino más bien a través de segundos mensajeros, o mediadores como es el caso del óxido nítrico, cuya reducción resulta en un incremento moderado de la sensibilidad hacia el agonista (Riba y cols 2004). Así, sabemos que en nuestro modelo experimental de cirrosis, existe un exceso de NO y una elevada Hcy plasmática (Ramirez, 1995).

Un hecho a tener en cuenta, es que existen datos bibliográficos que describen que el efecto de la Hcy es tiempo dependiente. En nuestro estudio, hemos utilizado un tiempo de incubación de 5 minutos, ya que vimos que era suficiente para producir cambios en la agregación plaquetaria. Pero posiblemente tiempos de incubación más largos incrementen los efectos agudos de la Hcy y esto se tendrá en cuenta en futuros experimentos. Por ello, es posible que el tratamiento crónico con ácido fólico para eliminar los efectos de la Hcy, sea más efectivo en descubrir el papel de la Hcy en plaquetas de ratas con LCB.

En la expresión de P-Selectina:

A pesar de utilizar dosis fisiológicas muy altas de Hcy para este estudio, observamos que no produjo ningún efecto en animales controles o cirróticos. A pesar de que la Hcy es capaz de aumentar la agregación plaquetaria, tras el estímulo con un agonista, no es capaz de producirlo de forma espontánea (Fig. 33), sugiriendo que la influencia de la Hcy sobre la activación plaquetaria es secundaria. Parece simplemente promover otros mecanismos que potencien dicho aumento.

Se piensa que la Hcy es rápidamente autooxidada en el plasma, para formar disulfuros mixtos y tiolactona de Hcy (Andersson y cols., 1995; Mohan y cols., 2008). Potentes especies reactivas de oxígeno son formadas durante esta auto-oxidación. La generación de superóxido dependiente de radicales hidroxilo iniciarían la peroxidación lipídica (Heinecke y cols., 1988; Loscalzo y cols., 1996; Mohan y cols., 2008). Lipoproteínas oxidadas de baja densidad, pueden inducir a la activación y ejercer un potente efecto aterogénico (Ardlie y cols., 1989; Mohan y cols., 2008). Otro estudio mostró que la Hcy estimulaba la liberación de ácido araquidónico (AA), para producir TXA_2 y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), llevando a un desbalance del estado redox e hiperactividad plaquetaria en humanos (Signorello y cols., 2002; Mohan y cols., 2008). Una HHcy inducida puede alterar el

metabolismo plaquetario proporcionando una liberación de sustancias protrombóticas y por lo tanto un posible mecanismo para la activación plaquetaria, terminando en una agregación, esto puede explicar la trombosis intravascular (Mohan y cols., 2008). Se ha descrito que el grado de HHcy está correlacionado con la reducción de la Proteína C, inhibiéndose así la actividad anticoagulante (Lentz y cols., 1996; Mohan y cols., 2008). Además, la Hcy induce una inhibición de más del 75 % de la antitrombina III, la síntesis anticoagulante del heparansulfato a través de una alteración inducida del potencial redox, sumado a ello hay un aumento de la expresión de la trombomodulina por la inactivación de la actividad de su cofactor y bloqueo del plasminógeno tisular unido a las células endoteliales (Leoncini y cols., 2003).

Hay varios estudios que indican que la Hcy reacciona con el NO para formar S-nitroso-Hcy, el cual tiene alguna de las propiedades del NO, representando un mecanismo protector contra las consecuencias adversas de una elevada Hcy. Sin embargo a altas concentraciones de Hcy y una larga exposición a las células endoteliales resulta en un daño en la producción de NO (Upchurch y cols., 1996; Stampfer y cols., 1993; Mohan y cols., 2008). La Hcy también reduce la actividad del NO por degradación oxidativa y por inhibición de la glutatión peroxidasa, resultando ser la Hcy la causante de un daño endotelial (Mohan y cols., 2008). Riba y colaboradores demostraron que la sensibilidad de las plaquetas al NO en presencia de HHcy se reduce significativamente, concluyendo que el NO modula el efecto de la Hcy en las plaquetas (Riba y cols., 2004; Mohan y cols., 2008).

Sin embargo el ácido fólico es capaz de normalizar la expresión de la P-selectina en animales LCB de 21 días (Fig. 43). Si bien hemos visto que la Hcy no es responsable del aumento de la expresión de P-selectina, entonces el ácido fólico no ejerce su efecto a través de ella. Un estudio realizado por Marillach y colaboradores, mostró que la suplementación de ácido fólico en ratas cirróticas inducía a un aumento en la fibrosis, concluyendo que una sobredosis de esta vitamina en pacientes con enfermedad hepática puede estar contraindicado causando efectos adversos (Marillach y cols., 2008). Sabemos que el folato juega un rol crítico en la síntesis de purinas y timidinas que van a influenciar el ciclo celular, la estabilidad del ADN y la apoptosis (Huang y cols., 1999; Marillach y cols., 2008). A pesar del gran número de estudios sobre los efectos de la suplementación con ácido fólico en modelos experimentales de cáncer y enfermedades cardiovasculares, no se ha estudiado en detalle su efecto sobre la función hepática (Kim, 2004; Marillach y cols., 2008). En este último estudio, el suplemento con ácido fólico reveló que las muestras hepáticas presentaban un alto contenido de colágeno, un alto número de células estelares activadas y un alto número de células apoptóticas parenquimales; además de grandes alteraciones en los marcadores serológicos de un hígado dañado (Marillach y cols., 2008). Por lo tanto, el tratamiento puede producir un cambio en la expresión de genes envueltos en la apoptosis y en la fibrosis en el hígado.



En la producción de ROS:

La HHcy se cree que ejerce sus efectos a través de un mecanismo que implica el daño oxidativo. Durante la auto-oxidación de la Hcy en el plasma, lo que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (el anión superóxido y peróxido de hidrógeno). Estas moléculas son potencialmente responsables de la disfunción endotelial asociada con HHcy (HHcy) (Loscalzo, 1996; Daví y cols., 2001).

Nuestros resultados confirman que la Hcy, en nuestros modelos de cirrosis es capaz de generar también un aumento de ROS, si bien este incremento en animales LCB de 21 días no alcanza a ser estadísticamente significativo, por la variabilidad de respuesta entre los animales, observamos una clara tendencia al incremento, comparada con el grupo control (Fig. 39). Como ya mencionamos, los ROS pueden ocasionar la peroxidación lipídica sobre la superficie endotelial, así como de partículas lipoprotéicas en el plasma (Kanani y cols., 1999; Dávi y cols., 2001). A su vez, la oxidación de lipoproteínas puede desencadenar la activación de plaquetas, así como algunas de las anormalidades hemostáticas que se han asociado con la HHcy. Por lo tanto, las modificaciones oxidativas inducidas por Hcy pueden contribuir a la patogenia de la trombosis en pacientes con HHcy (Loscalzo, 1996; Kanani y cols., 1996).

Tras el tratamiento crónico con el ácido fólico hubo una reducción significativa de producción de ROS tras ser las plaquetas incubadas con Hcy, pero no así tras ser estimuladas con otro agonista (ADP y Trombina). Este último caso puede deberse sobre todo a la variabilidad de las respuestas entre animales. Aun así, se observa una clara tendencia al efecto inhibitorio que ejerce el ácido fólico sobre la producción de ROS. Una vía por el cual el ácido fólico es capaz de reducir la producción de ROS, puede ser por un mecanismo auto-oxidativo que mejora el metabolismo de la Hcy, por lo tanto, la reducción de este aminoácido azufrado, conllevaría a un menor estrés oxidativo (Mahfouz y col., 2004).

EFFECTOS DE LA PRESENCIA DE ASCITIS (LCB ASC)

En la agregación:

En animales LCB la presencia de ascitis hace que la Hcy no produzca ningún efecto, es decir no consigue aumentar una agregación, ya de por sí muy disminuida. En estadios avanzados de cirrosis hepática, la disminución de la agregación plaquetaria que se observa, es consecuencia, entre otros factores, de la pérdida de disponibilidad de ácido araquidónico, con deterioro subsecuente de la síntesis de prostaglandinas por la plaqueta (Rubin y cols., 1979). Es posible que el deterioro de la membrana plasmática en estadios avanzados impida que la Hcy ejerza algún efecto.

Por otro lado, la agregación plaquetaria que basalmente se encuentra disminuida en los animales con cirrosis y ascitis, se redujo aún más tras el tratamiento crónico con ácido fólico. Lo cual también nos indicaría el efecto nocivo del ácido fólico en estadios muy avanzados de cirrosis biliar. El porcentaje de descenso para el área de agregación, fue de un 13,2 % con respecto a su grupo sin tratamiento, siendo también muy similar al grupo control (Fig. 42, Tabla 32). Pero en cuanto a la agregación máxima, llegó a un 40,9 % de descenso (Tabla L, anexos).

A pesar de ser el folato esencial para la síntesis de DNA y por ende en la reparación celular, el ácido fólico es un tratamiento común en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, usualmente empleadas para la corrección de la anemia (Stratton y cols., 2006). Además, está bien documentado que la deficiencia de folato se asocia con un mayor grado de insuficiencia hepática en pacientes con enfermedad hepática y en modelos experimentales (Halsted y cols., 2002; Esfandiari y cols., 2005). Sin embargo la posibilidad de un efecto perjudicial del exceso de ácido fólico en el curso de esta enfermedad no se ha investigado lo suficiente. Esta posibilidad puede tener relevancia clínica, dado el riesgo de los pacientes que reciben una sobredosis durante un periodo prolongado de tratamiento. Masillach y colaboradores demostraron que en ratas sometidas a inhalación con CCl_4 (un modelo de cirrosis) y tras la suplementación creciente de ácido fólico, observaron que había un incremento significativo de la expresión hepática del gen *Mmp7*, gen que está relacionado con la degradación con la matriz extracelular hepática que conduce a la fibrogenesis y deposición de colágeno aumentando así el grado de daño hepático. Además, y puesto que en el hígado se generan la mayoría de los factores de la coagulación, también éstos se encontraron disminuidos (Masillach y cols., 2008).

En la homeostasis del Ca^{2+} y expresión de P-Selectina:

En animales LCB con ascitis, la Hcy no produjo ningún aumento de calcio celular y la expresión de P-selectina en la plaqueta, los valores se mantuvieron muy similares a los controles tratados con cisteína. Es decir, los niveles basales y la entrada de calcio y expresión del receptor de activación, también se mantienen aumentados, pero no por ser tratadas agudamente con la Hcy. En cuanto a la ECC, la Hcy no aumentó ni la entrada ni salida del calcio. Por lo tanto no vimos ningún efecto apreciable con el tratamiento crónico con el ácido fólico. Una posible explicación para esta falta de efecto a la Hcy aguda, podría ser la exposición crónica a valores elevados de Hcy debido a la propia cirrosis o el deterioro estructural de las plaquetas en este estadio.

En la producción de ROS:

Observamos un claro aumento de producción de ROS (Fig. 39) en este grupo de estudio de cirrosis con ascitis. A pesar de que la Hcy es capaz de generar mayor ROS que el resto de los grupos de estudio, no existe una mayor agregabilidad o una mayor expresión de receptor de P-selectina, por lo que cabría pensar que en este estadio de la



enfermedad existe tal descompensación a nivel funcional que ni un aumento de Hcy, ROS o de expresión de receptores de activación (P-selectina) sería capaz de ocasionar estadios de riesgo de trombosis. ¿Qué es lo que sucede en esta etapa de la enfermedad en la que aparece la ascitis, que hace que las plaquetas pierdan la hiperagregabilidad que tenían en un estado colestático compensado? Las causas pueden ser multifactoriales, empezando por un mayor grado de daño hepático casi irreversible en esta etapa. Y los efectos citotóxicos per se de las ROS sobre las plaquetas causando la modificación oxidativas de sus biomoléculas y dando lugar a la alteración de la función celular. Y si bien el ácido fólico fue capaz de disminuir de forma significativa dicha respuesta ya sea frente a la trombina o a la incubación con Hcy (Fig. 49 y 50), este efecto podría ser perjudicial, ya que conduce a la respuesta de agregación hacia un estado de desequilibrio o gran hipo-respuesta.

EFECTO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares son el principal subproducto del colesterol y juegan un papel importante en el mantenimiento y formación de la bilis. Una cascada enzimática convierte el colesterol en los ácidos biliares primarios (ácido cólico y quenodesoxicólico (CDC)) en el hígado. Durante la circulación enterohepática, los ácidos biliares primarios, al someterse a una transformación bioquímica, como deshidroxilación, por la acción de las bacterias intestinales, producen los ácidos biliares secundarios (ácido desoxicólico (DC) y ácido litocólico) (Kasbo y cols., 2002). En el hígado, los ácidos biliares inducen el flujo biliar y la secreción de lípidos biliares; en el intestino, la absorción de lípidos de la dieta. Los ácidos biliares son también bacteriostáticos, y por eso la presencia de ácidos biliares conjugados podría contribuir a la esterilidad relativa usual del contenido del intestino delgado en la salud (Zuñiga y cols., 2003).

La cirrosis biliar está caracterizada por una alteración de la secreción hepato-biliar, como en consecuencia, los ácidos biliares y otros colepéptidos que son potencialmente tóxicos, se acumulan en el hepatocito y pueden conducir a lesiones de las células hepáticas, induciendo al estrés oxidativo y apoptosis, resultando un daño en el parénquima hepático (Pus y col., 2006; Monte y cols., 2009; Trottier y cols., 2012). La acumulación tóxica de los ácidos biliares es un sello de la enfermedad colestática crónica hepática. Su reducción es por eso una importante meta terapéutica. Cuando el flujo de bilis es reducido durante la colestasis, la simultánea sobre-regulación de los transportadores de los ácidos biliares en la membrana baso lateral y la baja regulación de los transportadores en las membranas apicales, favorece una ruta alternativa para la eliminación de los ácidos biliares de los hepatocitos (Dawson y cols., 2009). Estos cambios permiten la eliminación de los ácidos biliares del hígado a la sangre, pero no son suficientes para una completa desintoxicación de las células del hígado. La toxicidad de los ácidos biliares se asocia generalmente a sus propiedades anfifílicas (Hofmann, 1999) y el equilibrio entre caracteres hidrofílicos e hidrofóbicos difiere entre las especies de ácidos biliares (Monte y cols., 2009).

En nuestro estudio, se ha observado que ambos ácidos biliares, el ácido DC y el CDC aumentan el Ca^{2+} basal tanto en controles como en animales LCB de 21 días y con ascitis (Fig. 25). Posiblemente estos ácidos biliares actúan directamente sobre la superficie celular causando un incremento local de Ca^{2+} bajo la membrana plasmática. Este aumento de calcio puede ser suficiente para estimular la hidrólisis del PIP_2 , generación del IP_3 y DAG, produciendo así la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. Nuestros resultados concuerdan con lo observado por Nakajima y colaboradores, donde los ácidos biliares aumentan las concentraciones de calcio intracelular y producción de NO en las células endoteliales vasculares. Ellos concluyen que los ácidos biliares pueden ser responsables en parte de los cambios hemodinámicos observados en la cirrosis, induciendo a una hipotensión arterial debido a la dilatación periférica (Nakajima y cols., 2000; Lau y cols., 2005). De igual manera, el aumento de los ácidos biliares plasmáticos en la cirrosis colestática, podrían explicar en parte el aumento de los niveles basales de Ca^{2+} en las plaquetas de nuestros animales con LCB.

En la liberación y entrada de Ca^{2+} se observó una clara disminución con respecto a su control para cada grupo de estudio (Fig. 26 y 27), pero siendo de forma significativa para el ácido DC. Además, se aprecia una tendencia a la disminución de los almacenes de Ca^{2+} (Fig. 28). En cuanto a la ECC, vemos una clara tendencia a un aumento de Ca^{2+} tras al incubar con la taspigargina, lo cual indicaría que los ácidos biliares podrían tener efecto inhibitorio sobre la SERCA. Además, la entrada de Ca^{2+} (del exterior al interior celular), se ve significativamente más disminuida en los tres grupos de estudio tanto por el DC como por el CDC (Fig. 29). La ECC está disminuida en las plaquetas de los animales con LCB y el hecho de que los ácidos biliares produzcan una mayor disminución que en las plaquetas controles, nos llama la atención, ya que implicaría el rol citotóxico de estos ácidos biliares. Kim y colaboradores también dan evidencia, de que la mezcla de ácidos biliares aplicado a células pancreáticas podría inhibir la SERCA (Lau y cols., 2005; Kim y cols., 2002). Esta acción requiere la absorción celular de los compuestos biliares por transportadores específicos de los ácidos biliares o bien por su capacidad hidrofóbica pueden cruzar pasivamente las membranas plasmáticas. Respecto al primer mecanismo, el DC y CDC interactúan con los receptores celulares acoplados a algunas isoformas de PLC dependientes de Ca^{2+} (Kim y cols., 2002) y producir suficiente DAG para permitir la translocación de la isoforma convencional de la PKC (Ca^{2+} y DAG-dependiente) (Pinton y cols., 2002). Lau describe que el DC es capaz de activar al fosfolipasa C (PLC) efectivamente, trabaja a través del proteína G o tirosina kinasa, acoplada al receptor de superficie o a algún otro sistema no receptor de la proteína kinasa que es capaz de activar a la PLC. Respecto al segundo mecanismo, la literatura documenta que hidrofobicidad y la alta toxicidad del CDC y del DC en la carcinogénesis colorectal (Debruyne y cols., 2001; Lau y cols., 2005) y también en otro tipo de cánceres relacionados con el flujo gástrico. Se ha visto que el efecto permeabilizante los ácidos biliares (especialmente los monohidroxi como el taurolitocolato) es bastante selectivo para la membrana del RE, en los hepatocitos, pero no así en plaquetas por lo tanto dependerá del tipo de sales a las que las células estén expuestas (Coquil y cols., 1991). Nuestros resultados, aportan que en la cirrosis,



los ácidos biliares, pueden llegar a tener una acción sobre las señales de traducción intracelular y potencialmente contribuir a la alteración de las funciones celulares.

De todas maneras estos ácidos biliares no son capaces de producir ninguna alteración en la expresión de P-selectina, ni en controles ni en animales LCB (Fig. 24), también como dato preliminar tampoco observamos ninguna alteración en la agregación plaquetaria (datos no mostrados). Un estudio realizado en 1980 por Baele y colaboradores, estudiaron el efecto de las sales biliares (ácido glicoquenodesoxicólico, tauroquenodesoxicólico, glicólico, taurocólico y cólico) sobre la agregación en plasma rico en plaquetas (PRP) y vieron un claro efecto inhibitorio debido a que estas sales bajaban el pH del plasma. Sin embargo el ácido CDC fue el único en inducir la agregación (Baele y cols., 1980). Las sales conjugadas gradualmente cortan la membrana celular en piezas que hacen las células para convertirse en pequeñas esferas y que el cambio morfológico que producen sobre las plaquetas dependerá de la concentración y del tiempo de incubación (Shiao y cols., 1993). Por otra parte, se ha descrito que el DC tiene una actividad estimuladora del cAMP en las plaquetas, por lo tanto su acumulación tendría un efecto inhibitorio sobre la agregación (Takano & Suzuki, 1980; Shiao y cols., 1993). También se ha visto que el ácido CDC es capaz de disminuir la actividad de las células natural killer (NK) en pacientes con cirrosis y que el tratamiento con el ácido ursodesoxicólico (UDC) reducía el efecto del CDC ya que modifica la composición de los ácidos biliares circulantes en particular del CDC (Hirata y cols., 2002). Un estudio más reciente mostró también que el ácido DC era capaz de inhibir la agregación y la secreción de ADP, pero usaron concentraciones mayores a 10 mM y con una incubación de 10 minutos (Tan y cols., 2011). En nuestro estudio hemos utilizado una concentración 100 veces menor, ya que a esa concentración vimos un efecto en la homeostasis del Ca^{2+} . La misma concentración fue utilizada en todos nuestros estudios. Aun así, tal vez esa es una de las causas por la que no vimos ninguna respuesta en los estudio de agregación y expresión de P-selectina.

Recientemente un grupo en España, ha encontrado una buena respuesta al uso del ácido Ursodesoxicólico (UDC) como tratamiento en pacientes con cirrosis biliar, haciendo descender un 40 % los niveles de fosfatasa alcalina a casi niveles normales; sin embargo estos resultados no se ven en pacientes con una enfermedad más avanzada (Parés y cols., 2006). Un reciente meta-análisis ha demostrado que el tratamiento prolongado con dosis media (10-20 mg/Kg/día) mejora la bioquímica hepática y la supervivencia en un hígado trasplantado, en cambio también hay otros estudios en las que concluyen que el tratamiento con UDC no da ningún beneficio en la supervivencia (Chi y cols., 2006; Kumagi y cols., 2008). Un estudio reciente indica que el UDC actuaría sobre las plaquetas como un antagonista del receptor del colágeno ($\alpha 2b1$), por lo que podría tener una acción terapéutica en la reducción de eventos trombotico/fibróticos (Tan y cols., 2012). Hay pocos estudios que indiquen su acción directa sobre las plaquetas, lo cual sería interesante ver su acción para futuros estudios.

EFFECTO DE LAS CITOQUINAS

El daño al conducto biliar termina eventualmente en el daño hepático. La inflamación hepática es un importante factor de la colestasis hepática, tanto en humanos como en animales de experimentación. Tras la ligadura del conducto biliar, las células Kuffer son activadas como indicador de la actividad fagocítica e incrementan la formación de citoquinas y del factor activador de plaquetas (PAF). Además, el sistema de neutrófilos permite la formación de ROS después de la ligadura del conducto biliar, ya que estos neutrófilos activados se acumulan en el hígado (Gujral y cols., 2003). En un estudio realizado por Bemelmans y colaboradores, detectaron que la IL-6 y el TNF estaban elevados en el suero de ratones sometidos a una obstrucción biliar (Bemelmans y cols., 1992). Debido a que la P-selectina es un factor de activación plaquetaria, nosotros queríamos ver el papel de las citoquinas en dicha activación, pero a pesar de que el tiempo de incubación fue de 1 hora, no se observaron diferencias con respecto a su basal, tanto en controles como en animales LCB (Tabla 18). Por lo tanto, no podemos demostrar una relación entre estas citoquinas y el aumento en la expresión de la P-selectina encontrado en las plaquetas de los animales con colestasis descompensada.

VIII

CONCLUSIONES



1. Los animales con cirrosis biliar experimental, por ligadura del conducto biliar (LCB) sin presencia de ascitis, presentan una mayor agregación plaquetaria *in vitro*. Esta alteración está relacionada con una mayor movilización del Ca^{2+} intracelular, pero con una menor ECC. Sumado a ello, presentan sobre-expresión del receptor de activación (P-selectina) y una mayor producción de ROS. La presencia de ascitis, revierte parte de estas alteraciones, llegando incluso a producir una hipoagregación, que se acompaña de una gran disminución de la ECC y una excesiva producción de ROS.
2. El óxido nítrico (NO) tiene un papel en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en las plaquetas de animales LCB, ya que su ausencia hace que disminuya aún más la ECC.
3. Un aumento plasmático de ácidos biliares, como el desoxicólico (DC) y quenodesoxicólico (CDC), podría explicar en parte los niveles elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ plaquetario basal y la menor ECC en animales con cirrosis biliar experimental. Sin embargo estos ácidos biliares no están relacionados con la sobre-expresión de la P-selectina encontrada en los animales cirróticos sin ascitis.
4. El tratamiento crónico con ácido fólico, puede ser efectivo en la cirrosis biliar, en una fase pre-ascítica, ya que revierte la hiperagregación plaquetaria y produce una menor expresión de la P-selectina en respuesta a agonista. Esto se acompaña de una normalización en la producción de ROS y una menor liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, aunque sin cambios en la ECC.
5. Diversos factores plasmáticos (Hcy, NO, ácidos biliares) pueden contribuir a la hiper- excitabilidad plaquetaria de la cirrosis biliar experimental sin ascitis, mediante un aumento excesivo de los niveles de Ca^{2+} y/o producción de ROS. La aparición de ascitis reduce la duración de la respuesta de agregación, lo que puede ser explicado por la mayor producción de ROS.

IX

BIBLIOGRAFIA



- ⌘ **Adams JC y Lawler J.** 1993. Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin. *J cell Sci.* 104: 1061-71.
- ⌘ **Agarwal S, Joyner KA, Swaim MW.** 2000. Ascites fluid as a possible origin for hyperfibrinolysis in advanced liver disease. *Am J Gastroenterol.* 95: 3218-3224.
- ⌘ **Angiolillo DJ & Ferreiro Gutiérrez JL.** 2010. Inhibición del receptor plaquetario P2Y12 de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Revista Española de Cardiología.* 63: 60-76
- ⌘ **Alberts, Bray D, Lewis J y cols.** 2006. Molecular biology of the cellular. Miranda Robertson ed. Segunda edición. ED. Garland Publishing INC. NY.
- ⌘ **Alexandru N, Jardín I, Popov D, Simionescu M, García-Estañ J, Salido GM y Rosado JA.** 2008. Effect of homocysteine on calcium mobilization and platelet function in type 2 diabetes mellitus. *J Cell Mol Med.* 12 (6B): 2586-97.
- ⌘ **Aller Reyer MA, Nava Hidalgo MP, Palma Mezquida MD, López Álvarez L, Arias Pérez JL, Vara Ameigeiras E y Arias Pérez J.** 2001. Redistribución del peso lobular hepático en ratas con hipertensión portal prehepática crónica. *Cir Esp.* 70: 235-241.
- ⌘ **Alvares Cárdenas DF.** Factores asociados a Cirrosis hepática en los pacientes hospitalizados en el Servicio de Medicina del Hospital Daniel Alcides Carrion–Essalud de Tacna entre enero del 2006 y diciembre del 2008. Tesis Doctoral. Univ. Tacna-Perú. 2009.
- ⌘ **Álvarez Barrientos A, Callaghan R y O'Connor Blasco JE.** 2009. Análisis del estrés oxidativo por citometría del flujo.
- ⌘ **Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R Nombela C y Sánchez-Pérez M.** 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews.* 177: 95.
- ⌘ **Andersson A, Lindgren A, Hultberg B.** 1995. Effect of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction.. *Clin Chem.* 41:361-366.
- ⌘ **Amitrano L y cols.** 2000. Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology.* 31:345-8.
- ⌘ **Anant B, Parekh James W y Putney Jr.** 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev.* 85: 757– 810.
- ⌘ **Andrew Blann, Sunil K, Nadar y Gregory YH.** 2003. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Oxford Journals Medicine European Heart Journal.* 24P: 2166-2179.
- ⌘ **Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC and Berndt MC.** 2003. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochen Cell Biol.* 35: 1170-1174.
- ⌘ **Andus T, Bauer J y Gerak W.** 1991. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology.* 13: 364-75.
- ⌘ **Annani G, Weiner FR y Zern MA.** 1992. Increased Transforming Growth Factor-1 gene expression in human liver disease. *J. Hepatol.* 14: 259-64.

-
- ⊗ **Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP y Pimienta-Jiménez H.** 2004. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: Aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol.* 39 (2): 156-165.
 - ⊗ **Arduini A.** Regulación de la biogénesis mitocondrial y de la biogénesis ribosomal en la cirrosis biliar secundaria en ratas. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. 2009.
 - ⊗ **Ardlie NG, Selley ML, Simons LA.** 1989. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 76:117-124.
 - ⊗ **Armendariz-Borunda J, Katayama y Seyer DM.** 1992. Transcriptional mechanisms of type 1 collagen gene expression are differentially regulated by Interleukin-1, tumor necrosis factor α and transforming growth factor in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267: 14316-14321.
 - ⊗ **Armstead VE, Minchenko AG y Schuhl RA y cols.** 1997. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 273(2 Pt 2): H740-H744.
 - ⊗ **Aruoma OI.** 1996. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 675-705.
 - ⊗ **Asadpour, S, Soleimanirad J, Roshangar L, Karami H.** 2013. Effect of Buthionine Sulfoximine Administration on Serum Glutathione Level in Pregnant and non-Pregnant Mice. *Zahedan J Res Med Sci* 15(5): 9-12
 - ⊗ **Atucha NM, García-Navarro E, Ramírez F y cols.** 2005. El intercambiador sodio/calcio contribuye a la homeostasis del calcio en plaquetas de ratas con LCB. *Gastroenterol. Hepatol.* 28 (1): 69.
 - ⊗ **Atucha NM, Iyu D, Alcaraz A, Rosa V, Martínez-Prieto C, Ortiz MC, Rosado JA, García-Estañ J.** 2007. Altered calcium signalling in platelets from bile-ligated rats. *Clinical Science.* 112: 167-174.
 - ⊗ **Atucha NM, Nadal FJ, Iyu D y Garcia-Estañ J.** 2002. Papel del Óxido Nítrico en la cirrosis hepática experimental. *Nefrología.* Vol. 5: 25-28.
 - ⊗ **Badley BWD, Murphy GM, Bouchier IA y Sherlock S.** 1969. The role of bile salts in the steatorrhea of chronic liver disease. (abstr.) *Gastroenterology.* 56: 1136.
 - ⊗ **Baca Morilla Yolanda.** Mecanismos implicados en la hipertensión arterial inducida por aumento de estrés oxidativo: Interacciones con otros factores patogénicos. Tesis Doctoral. Univ. Granada. Facultad de Medicina, Dpto de Fisiología. 2013.
 - ⊗ **Baele G, Beke R, Barbier F.** 1980. In vitro inhibition of platelet aggregation by bile salts. *Thromb Haemost.* 44(2): 62-4.
 - ⊗ **Bandi JC, Poch E, García-Pagán JC y cols.** 1997. Platelet cytosolic calcium concentration in patients with liver cirrhosis. Relationship with hepatic and systemic hemodynamics. *J Hepatol.* 27: 824-829.
 - ⊗ **Barber AE, Coyle SM, Marano MA y cols.** 1993. Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J. Immunol.* 150: 1999-2006.
 - ⊗ **Barton BE.** 1997. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopath.* 85: 16-20.



- ⌘ **Basora M y Llau V.** 2008. Hidroxietil almidones y su relación con la hemostasia. *Info Colloids.* 3-14.
- ⌘ **Becker RC, Dintel DJ y Green D.** 2006. *Antithrombotic Therapy.* 4ª ed. NY: Professional Communications, Inc: 15-23.
- ⌘ **Beckman KB y Ames BN.** 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78: 547-581.
- ⌘ **Bellas RE, Lee JS y Sonenshein GE.** 1995. Expression of a constitutive NF-kappa B – like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J. Clin Invest.* 96: 2521–2527.
- ⌘ **Burjel L, Cordoba M, Ribeiro L y Thomas C.** 2007. Homocisteinemia basal y post sobrecarga de metionina Experiencia en una Unidad de Prevención y Seguimiento de Riesgo Cardiovascular. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 41(1): 21-5.
- ⌘ **Nidhal Ben-Amor N, Redondo PC, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM y Rosado JA.** 2006. A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by *de novo* conformational coupling in human. *J Physiol* 570(2): 309–323.
- ⌘ **Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW y Buurman WA.** 1992. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology.* 15(6):1132-6
- ⌘ **Ben-Ari Z, Panagou M, Patch D y cols.** 1997. Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosis cholangitis evaluated by thrombelastography. *J. Hepatol.* 26: 554–559.
- ⌘ **Bennett JS y Vilaire G.** 1979. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin Invest.* 64: 1393-406.
- ⌘ **Bennett JS.** 1991. The molecular biology of platelet membrane proteins. *Blood.* 27: 186-204.
- ⌘ **Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kviety PR, Granger DN.** 1984. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol.* 247:G486-93.
- ⌘ **Biagini MR, Guadascione M, McCormick AP, Raskino C, McIntyre N y Burroughs AK.** 1990. Bleeding varices in PBC and its prognostic significance. *Gut.* 31: A1209.
- ⌘ **Biagini MR, Tozzi A, Marcucci R, y cols.** 2006. Hyperhomocysteinemia and hypercoagulability in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 12: 1607–12.
- ⌘ **Boffar K.** 2007. Manejo Quirúrgico del Paciente Politraumatizado (DSTC). Edit. Médica Panamericana. 2ª Edición. Cap. 2: 11-13.
- ⌘ **Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA y cols.** 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med.* 17: 389-93.
- ⌘ **Bootman MD, Berridge MJ y Roderick HL.** 2002. Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Journal PNAS.* 99: 7320-7322.

-
- ⊗ **Bosy-Westphal A, Ruschmeyer M, Czech N, Gerd O, Hinrichsen H, Plauth M, Lotterer E, Fleig W y Müller MJ.** 2003. Determinants of hyperhomocysteinemia in patients with chronic liver disease and after orthotopic liver transplantation. *American Journal Clinical Nutrition.* 77: 1269-1277.
 - ⊗ **Boushey CJ, Baresford SA, Omenn GS y Motulsky AG.** 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA.* Vol.274: 1049-1057.
 - ⊗ **Bosch J y Reverter JC.** 2005. The coagulopathy of cirrhosis: myth or reality? *Hepatology* 41:434-435.
 - ⊗ **Box HC, Dawidzik JB y Budzinski EE.** 2001. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med.* 31(7): 856-868.
 - ⊗ **Brandtzaeg P.** 1996. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 216:1 5–37.
 - ⊗ **Brass LF.** 2003 Thrombin and Platelet Activation. *Chest.* 124:18S-25S.
 - ⊗ **Brass LF, Manning DR, Cichowski K y Arams CS.** 1997. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb Haemost.* 78 (1): 581-589.
 - ⊗ **Brill A, Rivo O, Rivo J, Gozal Y y Varon D.** 2005. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 67 (1): 30-8.
 - ⊗ **Bustíos C, Dávalos M, Román, R y Zumaeta E.** 2004. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. *Rev Gastroenterol Perú.* 27: 238-245.
 - ⊗ **Caccese D, Pratico D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, Iuliano L, Violi E.** 2000. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation—role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost.* 83: 485–490.
 - ⊗ **Calandra T, Gerain J, Heumann D y cols.** 1991. High circulating levels of Interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. *Am. J. Med.* 91: 23-9.
 - ⊗ **Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, Macik BG, Northup PG, Reddy KR, Tripodi A, Sanyal AJ y Coagulation in liver disease Group.** 2006. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology.* 44: 1039-1046.
 - ⊗ **Calmus Y, Guechot J, Podevin P y cols.** 1992. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on Interleukin 1, Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor- α production by monocytes. *Hepatology.* 16: 719-23.
 - ⊗ **Camacho P y Lecheleiter JD.** 1995. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca^{2+} waves. *Cell.* 82: 765-771.
 - ⊗ **Campas SP y Baumann H.** 1992. Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol.* 12(4): 1789-97.



- ∞ **Camussi G, Albano E, Tetta C y Bussolino F.** 1991. The molecular action of TNF. *FEBS Lea.* 3-14.
- ∞ **Carafoli E.** 1992. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *Biology Chemistry.* 5: 2115-8.
- ∞ **Carlson CR, Grallert B, Bermander R, Stokker T y Boye E.** 1997. Measurement of Nuclear DNA content in Fission Yeast by Flow Citometry. *Yeast.* 13 (14): 1329-1335.
- ∞ **Carnicer JM, Bernardini S, Bellincampi L, Noguera NI, Nuccetelli M, Ammatuna E, Breccia M, Lo-Coco F y Federici J.** 2006. Role of γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) gene expression as marker of drug sensitivity in acute myeloid leukemias. 365(1-2): 342-345.
- ∞ **Castaño Ruiz M.** Papel de la pravastatina en el daño miocárdico por isquemia y repercusión. Tesis Doctoral. Univ. de Salamanca. 2010.
- ∞ **Castellanos Fernández MI.** 2003. Nutrición y cirrosis hepática. *ACTA MÉDICA.* 11(1):26-37.
- ∞ **Cavallini L, Coassin M y Alexandre, A.** 1995. Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem J.* 310: 449-452
- ∞ **Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R y cols.** 1994. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci US.* 91(19): 8767-8771.
- ∞ **Chen H y Tappel AL.** 1995. Protection of Vit. E, Se, trolox C, Vit. C, Against Oxidative Damage to Rat Blood and Tissue in vivo. *Free Radic Biol. Med.* 18: 949-953.
- ∞ **Shi J, Wu C, Lin Y, Chen YX, Zhu L y Xie WF.** 2006. Long-term effects of mid-dose ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol.* 101:1529-1538.
- ∞ **Churchill GC, Okada Y, Thomas JM, Genazzani AA, Patel S y Galione A.** 2002. NAADP mobilizes Ca²⁺ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 111:703-708.
- ∞ **Ciccone A, Abraha I y Santill I.** 2006. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.* 18 (4).
- ∞ **Colman RW.** 1984. Surface mediated defence reaction. The plasma contact activation system. *J. Clin Invest.* 73: 1249-56.
- ∞ **Coquil JF, Berthon B, Chomiki B, Combettes L, Jourdon J, Schteingart C, Serlinger S y Claret M.** 1991. Effects of taurothiocholate, a Ca²⁺-mobilizing agent, on cell Ca²⁺ in rat hepatocytes, human platelets and neuroblastoma NG108-15 cell line. *Biochem. J.* 273, 153-160.
- ∞ **Córdova Pluma VH, Vargas Viveros P, Vega C, Quintero M y Hurtado Monroy R.** 2011. Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Med Int Mex.* 27(1): 58-74.
- ∞ **Criado M, Flores O, Ortíz MC, Atucha NM, Arévalo M, García-Estañ J, López-Novoa JM.** 1997. Elevated glomerular and systemic NO production in rats with chronic bile duct ligation: role of an inducible nitric oxide synthase. *Hepatology.* 26: 268-276.

-
- ⊗ **Chazot C y Kopple JD.** 2004. Vitamin Metabolism and Requirements in Renal Disease and Renal Failure. En: Kopple JD, Massry SG, eds. *Nutritional Management of Renal Disease*. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.pp: 315-356.
 - ⊗ **Dachary PR.** Estudio comparativo de las soluciones de preservación de Celsior y de la Universidad de Wisconsin en el trasplante de hígado. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Universidad de Valencia. 2008.
 - ⊗ **Daniel de L, Fernández N y Aller R.** 2004. Homocisteína en el paciente con diabetes mellitus. *Med Clin.* 122: 27-321.
 - ⊗ **Darley-USmar V, Wiseman H y Halliwell B.** 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369: 131-135.
 - ⊗ **Dayal S, Devlin AM, McCaw RB, Liu ML, Arning E, Bottiglieri T y cols.** 2005. Cerebral vascular dysfunction in methionine synthase deficient mice. *Circulation.* 112:737-44.
 - ⊗ **Dawson PA, Lan T y Rao A.** 2009. Bile acid transporters. *J Lipid Res.*50:2340-57.
 - ⊗ **Debruyne PR, Bruyneel EA, Li X , Zimber A, Gespach C y Mareel MM.** 2001. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res.* 480-481 359-369.
 - ⊗ **De Bree A, Verschuren W, Kromhout D, Kluijtmans LA y Henk.** 2002. Homocysteine determinants and the Evidence to What Extent Homocysteine Determines the Risk of Coronary Heart Disease. *Journal Blom Pharmacol.* 54: 599.
 - ⊗ **Dedkova EN y Blatter LA.** 2002. Nitric oxide inhibits capacitative calcium entry and enhances endoplasmic reticulum calcium uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol.* 539: 77-91.
 - ⊗ **De la Cruz JP, García PJ y Sánchez DLC.** 1992. Dipyridamole inhibits platelet aggregation induced by oxygen-derived free radicals. *Thromb Res.* 66: 277-285.
 - ⊗ **Del Conde I, Shrimptom CN, Thiagarajan P y López JA.** 2005. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 106: 1604-11.
 - ⊗ **Del Hey A y Besedavsky O.** 1992. Metabolic and neuroendocrine effects of proinflammatory cytokines. *Eur J Clin Invest.* 22 (1): 10-15.
 - ⊗ **DeLoughery TG.** 2004. Hemostasis and Trombosis. 2da Ed. Georgetown: *Landes Bioscience.* 217.
 - ⊗ **Denis CV, Terraube V, Robert K y Janel N.** 2003. Elevated plasma von Willebrand factor in a murine model of severe hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost.* 90:362-4.
 - ⊗ **Dennis K J, Shibamoto T.** 1989. Gas Chromatographic determination of malonaldehyde formed by lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.* 7: 187-191.
 - ⊗ **Di Minno G, Davi G, Margaglione M y cols.** 1993. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria: evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J. Clin Invest.* 92: 1400-6.



- ∞ **Díaz-Ricart OA.** 2000. Interacción de las plaquetas con la pared vascular y activación por las estructuras sub-endoteliales. Servicio de Hemoterapia y hemostasia. Univ. Barcelona.
- ∞ **Doi K, Okamoto K, Negishi N, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, Ishii S, Shimizu T y Noiri Y.** 2006. Attenuation of Folic Acid-Induced Renal Inflammatory Injury in Platelet-Activating Factor Receptor deficiency mice. *Am. J Pathol.* 168: 1413–1424.
- ∞ **Dunyaporn T, Alexandre J y Pen H.** 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery.* 8: 579-59.
- ∞ **Durand F & Valla D.** 2008. Assessment of Prognosis of Cirrhosis. *Seminars in Liver Disease.* Complication of cirrhosis. France. 28 (1): 110-122.
- ∞ **Durand P, Prost M y Blache D.** 1997. Folic Acid Deficiency Enhances Oral Contraceptive-Induced Platelet Hyperactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1939-1946.
- ∞ **Ebrahimkhani MR, Sadeghipour H, Dehghani M, Kiani S, Payabvash S, Riazi K, Honar H, Pasalar P, Mirazi N, Amanlou M, Farsam H, Dehpour AR.** 2005. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Sci.* 76 (21): 2497-512.
- ∞ **Eckardstein A, Malinow MR, Upson B, Heinrich J, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, Assmann G.** 1994. Effects of Age, Lipoproteins, and Hemostatic Parameters on the Role of Homocyst(e)inemia as a Cardiovascular Risk Factor in Men *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 14: 460-464.
- ∞ **Edge R, McGarvey DJ y Truscott TG.** 1997. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology.* 41: 189-200.
- ∞ **Eizayaga FX, Aguejof O, Belon P y Doutremepuich C.** 2005. Platelet aggregation in portal hypertension and its modification by ultra-low doses of aspirin. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 34(1): 29-34.
- ∞ **Elias JA & Katlaff H.** 1991. Mononuclear cell-fibroblast interactions in the human lung. *Chest.* 99(3): 73s-79s.
- ∞ **Elstad MR, La Pine TR, Cowley FS y cols.** 1995. P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J Immunol.* 155(4): 2109–2122.
- ∞ **Escorza MA y Calderón Salinas.** 2009. Capacidad Antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica (REB).* Univ. Nacional de México. 28(3): 89-101.
- ∞ **Espinós D y Villegas AM.** 2001. Bioquímica y Metabolismo de la Vitamina B12 y Ácido Fólico. *Enciclopedia Iberoamericana de hematología de Salamanca.* 199: 253-262.
- ∞ **Essex D, Li M, Feinman RD y Miller A.** 2004. Platelet surface glutathione reductase-like activity. *Blood.* 104 (503): 1383-1385.
- ∞ **Esfandiari F, Villanueva JA, Wong DH, French SW y Halsted CH.** 2005. Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: 54–63.
- ∞ **Fava y cols.** 1997. Folate, vitamin B12 and homocysteine in major depressive disorder. *Journal American Psych.* 154: 426-28.

-
- ⊗ **Ferrer, JC.** 2001. Problemas cardiopulmonares en los pacientes con cirrosis hepática. Servicio de medicina Interna/Hepatología, Univ. Autónoma de Barcelona.
 - ⊗ **Floch MH, Gershengoren W, Elliott S y Spiro HM.** 1971. Bile acid inhibition of the intestinal microflora a function for simple bile acids. *Gastroenterology*. 61: 228-233.
 - ⊗ **Florian Kro"tz, Hae-Young Sohn y Ulrich Pohl.** 2004. Reactive Oxygen Species Players in the Platelet Game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24: 1988-1996.
 - ⊗ **Forrellat Barrios M & Gautier du Defaix Gómez Hortensia.** 1997. Papel del ácido Fólico en la etiología de las anemias megaloblasticas. *Rev. Cubana de Hematología Inmunología Hemoter*. 13: 77-89.
 - ⊗ **Forrest EH, Dillon JF, Campbell TJ, Newsome PN y Hayes PC.** 1996. Platelet basal cytosolic calcium: The influence of plasma factors in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 25(3): 312-315.
 - ⊗ **Fox JEB, Reynolds CC y Johnson MM.** 1987. Identification of glycoprotein Ib as one of the major proteins phosphorylated during exposure of intact agents that that activate cyclic AMP-dependent kinase. *Journal Biologioc Chemistry*. 262: 12627-12631.
 - ⊗ **Frangogiannis NG, Smith CW y Entman ML.** 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 53(1): 31-47.
 - ⊗ **Freedman JE, Frei B, Welch GN y Loscalzo J.** 1995. Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J. Clin Invest*. 96: 394-400.
 - ⊗ **Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR y Michelson AD.** 1996. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J. Clin Invest*. 97: 979-987.
 - ⊗ **Freedman JE y Loscalzo J.** 2002. Platelet-Monocyte Aggregates Bridging Trombosis and Inflammation. *American Herat Association Circulation*. 105: 2130.
 - ⊗ **Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA y Rodgers GM.** 1993. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and trombosis, induces tissue factor activity in endotelial cells. *Arterioscler & Trombosis*. 13: 1327-1333.
 - ⊗ **Fujimoto T, Fujimura K y Kuramoto A.** 1991. Functional Ca²⁺ channel produced by purified platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated in to planar phospholipid bilayer. *Thromb Haemost*. 6(5): 598-603.
 - ⊗ **Fujimoto TT, Noda M, Takafuta T y cols.** 1996. Expression and functional characterization of the P-selectin glycoprotein ligand-1 in various cells. *Int J Hematol*. 64(3-4): 231-239.
 - ⊗ **Furie B y Furie BC.** 1996. P-selectin induction of tissue factor biosynthesis and expression. *Haemostasis*. 26 (1): 60-65.
 - ⊗ **Furie B y Furie BC.** 1992. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J Med*. 326: 800-6.



- ⌘ **Galan C, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM y Rosado JA.** 2009. STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin and ADP-induced aggregation in human platelets. *Arch Biochem Biophys* 490: 137-144.
- ⌘ **Galione A & Petersen Ole H.** 2005. The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation? *Molecular. Interv.* 5: 73-79.
- ⌘ **García Allut JL.** Estudio de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y síndrome de disfunción multi-orgánica papel de las interacciones celulares. Tesis doctoral. Univ. Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina. 2000.
- ⌘ **García Alonso FJ.** Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis Doctoral. Univ. Murcia. 2005.
- ⌘ **García MB.** Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica en la Isquemia/Reperusión y Trasplante Renal. Efectividad de Cardiotrofina-1. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Univ. Salamanca. 125-126. 2011.
- ⌘ **García Mesa M y Coma AC.** 2000. Características Estructurales y funcionales de las Plaquetas. *Rev. Cubana Angiol y Cir Vasc.* 1: 132-141.
- ⌘ **García T, Morín BS, Céspedes MA, Caples EM, Olembe H y cols.** 1994. Radicales libres: ¿Sueños moleculares o realidades clínicas? *Rev. Cub. Inv. Biomed.* 13: 12-18.
- ⌘ **García-Estañ J, Ortiz MC y Lee SS.** 2002. Nitric oxide and renal cardiac dysfunction in cirrosis. *Clinical Science.* 102: 213-222.
- ⌘ **García RM.** Mecanismos celulares y moleculares de la patología vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar. El papel de las filarias y de los endosimbiontes del género *Wolbachia*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 2009.
- ⌘ **García-Tevijano E, Berasain C, Rodríguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martín-Duce A, Caballería J, Mato JM y Ávila M.** 2001. Hyperhomocysteinemia in Liver Cirrhosis: Mechanisms and Role in Vascular and Hepatic Fibrosis. *Hipertensión.* 38: 1217-1221.
- ⌘ **Gear AR y Schneider W.** 1975. Control of platelet glycogenolysis. Activation of phosphorylase kinase by calcium. *Biochim Biophys Acta.* 392: 111-120.
- ⌘ **Jaspreet S, Farhood GA, Bajt ML y Jaeschk H.** 2003. Neutrophils Aggravate Acute Liver Injury During Obstructive Cholestasis in Bile Duct–Ligated Mice. *Hepatology.* 38: 355-363.
- ⌘ **Genazzani AA y Galione A.** 1996. Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-insensitive pool. *J. Biochem.* 315:721–725.
- ⌘ **Genescà J y Buti M.** 2004. Citocinas y cirrosis hepática. *Med Clin (Barc).* 122(12):457-8.
- ⌘ **Gerasimenko O y Gerasimenko J.** 2004. New aspects of nuclear calcium signalling. *Journal Cell Science* 117: 3087-3094.
- ⌘ **Gerdes VE, Hovinga HA, Cate H, Macgillavry MR, Leijte A, Reitsma PH, Brandjes DP, Buller HR y The Amsterdam Vascular Medicine Group.** 2004. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation. *Journal Thromb Haemost.* 2(3): 445-451.
- ⌘ **Ginès P, Chantar C y Rodes J.** 1989. Historia natural y factores pronósticos de la cirrosis hepática. *Actualidades en Gastroenterología y Hematología. Barcelona.* 67-89.

-
- ⊗ **Givan AL.** 1992. Flow Citometry. First principles. New York: Wiley-Liss.
 - ⊗ **Gores GJ, Wiesner RH, Dickson ER y cols.** 1989. Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 96: 1552–1559.
 - ⊗ **Gotsch U, Jager U, Dominis M y cols.** 1994. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun.* 2(1): 7–14.
 - ⊗ **Greenwel P, Hubin J, Schwartz M y cols.** 1993. Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, Interleukin-6, and Connexin. *Lab Invest.* 69: 2 10-6.
 - ⊗ **Greenwel P, Schwartz M, Rasas M y cols.** 1989. Characterization of fat-storing cali mes derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. *Lab Invest.* 65: 644-53.
 - ⊗ **Gregory T y Everson MD.** 2005. Hepatitis C Virus Treatment of Hepatitis C in Patients Who have decompensated cirrhosis. *Clinics in Liver Disease.* 9(3), 473-486.
 - ⊗ **Grimble RF.** 2006. The Effects of Sulfur Amino Acid Intake on Immune Function in Humans. *Journal Nutritional.* 136: 1660-1665.
 - ⊗ **Grynkiewicz G, Poenie M y Tsien RY.** 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 (6): 3440-3450.
 - ⊗ **Guillet C, Fourcin M, Chevalier S, Pouplard A y Gascan H.** 1995. ELISA detection of circulating levels of LIF, OSM and CNTF in septic shock. *Ann NY Acad Sci.* 762: 407-12.
 - ⊗ **Guyton & Hall JE.** 2010. Textbook of Medical Physiology. 12th edition. Edit. Saunders.
 - ⊗ **Gullapalli S & Barron AR.** 2010. Optical Characterization of Group 12-16 (II-VI) Semiconductor Nanoparticles by Fluorescence Spectroscopy. Version 1.1
 - ⊗ **Hackey DC, Maher JJ, Jarnagin WR y cols.** 1992. Inhibition of rat hepatic lymphocyte activation in culture by Interferon-γ. *Hepatology.*16: 776-84.
 - ⊗ **Hajjar KA.** 1993. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J. Clin. Invest.* 91: 2873-9.
 - ⊗ **Hall RI, Smith MS y Rocker G.** 1997. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg.* 85(4): 766-82.
 - ⊗ **Halsted CH, Villanueva JA y Devlin AM.** 2002. Folate deficiency, methionine metabolism, and alcoholic liver disease. *Alcohol.* 27: 169–172.
 - ⊗ **Handin RI, Karabin R y Boxer GJ.** 1977. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 59: 959 –965.
 - ⊗ **Harpel PC, Chang VT y Borth W.** 1992. Homocysteine and Other Sulfhydryl Compounds Enhance the Binding of Lipoprotein (a) to Fibrin: A Potential Biochemical Link between Thrombosis, Atherogenesis, and Sulfhydryl Compound Metabolism. *Journal PNAS.* 89: 10193-10197.



- ⌘ **Hawkins R.** 2002. Increased Homocysteine in liver Cirrhosis: A Result of Renal Impairment? *Clinical Chemistry*. 48(5): 796-797.
- ⌘ **Heemskersk JMW y Sage SO.** 1994 Calcium signalling in platelets and other cells. *Platelets* 5: 295–316.
- ⌘ **Heinecke JS, Cerruti PA, Cerruti JM, McCord I, Fridovich.** 1988. Superoxide mediated oxidation of low density lipoproteins by thiols. In: eds. *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology*; 1988: 433-457.
- ⌘ **Heinrich PC, Castell JV y Andus T.** 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *J. Biochem.* 265: 621-36.
- ⌘ **Henle E y Linn S.** 1997. Formation, Prevention, and Repair of DNA damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 19095-19098.
- ⌘ **Henriksen JH, Fuglsang S, Bendtsen F, Christensen E y Moller S.** 2001. Arterial compliance in patients with cirrhosis: stroke volume-pulse pressure ratios as simplified index. *American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiol.* 280: 584-594.
- ⌘ **Kimura H, Ishibashi T, Shikama Y, Okano A, Akiyama Y, Uchida T y Yukio Maruyama.** 1990. Interleukin-1 α (IL-1 α) induces thrombocytosis in mice: Possible Implication of IL-6. *Blood*. 76(12): 2493-2500.
- ⌘ **Hills LD & Lange RA.** 1991. Serotonin and ischemic heart disease. *N Eng J Med*. 324: 688-90.
- ⌘ **Hirana T, Yasukawa K, Harada H y cols.** 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (RSF-2) that induces 6 lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 324: 73-6.
- ⌘ **Hofmann AF.** 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol Sci*. 14: 24–9.
- ⌘ **Iván F, Palomo G, Constanza I, Torres U, Rodrigo E, Moore-Carrasco, Marcelo A, Alarcón L, Patricio J y Maragaño L.** 2009. Platelet antiaggregants: mechanisms of action and use asocied risks. *Vitae*. vol.16 no.1.
- ⌘ **Kasbo JJ, Saleem MM, Perwaiz SS, Mignault DD, Lamireau TT, Beatriz B, Tuchweber y Ibrahim I Yousef.** 2002. Biliary, fecal and plasma deoxycholic acid in rabbit, hamster, guinea pig, and rat: comparative study and implication in colon cancer. *Biol Pharm Bull*. 25(10):1381-4.
- ⌘ **Masaru Hirata, Harihara Y, Kita Y, Saito H, Nishimura M, Hiroyuki Y, Sano S, Ito M, Kusaka K, Kawarasaki H, Hashizume K y Makuuchim M.** 2002. Immunosuppressive Effect of Chenodeoxycholic Acid on Natural Killer Cell Activity in Patients with Biliary Atresia and Hepatitis C Virus-Related Liver Cirrhosis *Digestive Diseases and Sciences*. 47, 5: 1100–1106.
- ⌘ **Hoffman M y Monroe DM.** 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 85: 958-65.
- ⌘ **Hoffman M, Monroe y Rethinking DM.** 2005. Coagulation Cascade. *Curr Hemato.*4: 391-6.
- ⌘ **Hoffman M y Monroe DM.** 2002. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vascular Biology*. 1: 1381-1389.

-
- ⊗ **Hongqun L, Song D y Lee SS.** 2001. Role of heme oxygenase-carbon monoxide pathway in pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in the rat. *American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280: 68-74.
 - ⊗ **Hong-Sheng Z, Jun-Hua X, En-Hua C y Jin-Fen Q.** 2005. Homocysteine inhibits store-mediated calcium entry in human endothelial cells: Evidence for involvement of membrane potential and actin cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 269(1): 37-47.
 - ⊗ **Hoth M y Pender R.** 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355(6358): 353-356.
 - ⊗ **Houglum K, Buck M, Adir V y cols.** 1994. LAP (NF-1L6) trans-activates the collagen alpha gene from a 5' regulatory region. *J. Clin Invest.* 94:808-14.
 - ⊗ **Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT y Wei YH.** 2003. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J. Biomed Sci.* 10(2): 170-8.
 - ⊗ **Hynes RO.** 1991. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost.* 66: 40-3.
 - ⊗ **Huang RFS, Ho YH, Lin HL, Wei JS y Liu TZ.** 1999. Folate deficiency induces a cell cycle-specific apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr* 129:25–31, 1999.
 - ⊗ **Ichinari K, kakei M, Matsuoka H, Nakashima H y Tanaka H.** 1996. Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cell: its potentiation by Mg ADP. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 272: 63-68.
 - ⊗ **Inesi G.** 1987. Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 262: 16338-16342.
 - ⊗ **Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D y Violi F.** 1997. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med.* 22: 999–1006.
 - ⊗ **Iyu Espinosa D.** Homeostasis del calcio en Plaquetas de ratas Cirróticas. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. 2005.
 - ⊗ **James P, Inui M, Tada M, Chiesi M y Carafoli E.** 1989. Nature and site of phospholamban regulation of Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* 342: 90-92.
 - ⊗ **Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Cutis L, Machalinski B, Ratajczak J y cols.** 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 113: 752–60.
 - ⊗ **Jeyachristy A, Sam L, Arumugam G, Rajagopal S, Arunachalam S, Lavanya K, Kumar S, Prakash J y Aru S.** 2009. Level of nitrated proteins in the plasma, platelets and liver of patients with liver cirrhosis. *Redox Report.* 14(6): 259-266.
 - ⊗ **Jardin I, López JJ, Gines M, Salido y Rosado JA.** 2008. Orai1 Mediates the Interaction between STIM1 and hTRPC1 and Regulates the Mode of Activation of hTRPC1-formin Ca²⁺. *The journal of biological chemistry.* 283 (37): 25296–25304.



- ⌘ **Jardin, I, Ben Amor N, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM. y Rosado JA.** 2007. Differential involvement of thrombin receptors in Ca^{2+} release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem J* 401, 167-174.
- ⌘ **Jardín polo I.** 2011. Complejos STIM1-Orai1-TRPC en la entrada de Ca^{2+} en plaquetas humanas. Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Extremadura Facultad de Veterinaria. Depto. de Fisiología.
- ⌘ **Jiménez-Sánchez G, Silva-Zolezzi I. Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A y Vázquez Contreras E.** 2003. Bases bioquímicas y fisiopatológicas de las enfermedades peroxisomales. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⌘ **Juan Marco ML, Rosell Mas AI y Renau Rafecas FJ.** 2000. Hemostasia y Trastornos Hemorrágicos. *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario valencia.*
- ⌘ **Julio C, Sánchez, Diego F, López-Zapata, César R y Romero-Leguizamó.** 2010. Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad. Revision Univer de Granada. *Rev. Neurología.* 51 (10): 624-632.
- ⌘ **Juska A, Jardin I y Rosado JA.** 2008. Physical properties of two types of calcium stores and SERCAs in human platelets. *Mol Cell Biochem.* 311:9-18
- ⌘ **Kameda H, Morita I, Handa M y cols.** 1997. Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin. *J. Haematol.* 97: 348-55.
- ⌘ **Kameda H, Morita I, Handa M y cols.** 1997. Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin. *Br. J. Haematol.* 97: 348-355.
- ⌘ **Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL y cols.** 1999. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation.* 100: 1161-1168.
- ⌘ **Kelley.** 1992. Medicina Interna. 2ª Edición. Editorial Panamericana. Cap. 192.
- ⌘ **Kenneth HH, Floy RA y Robert A.** 2002. Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in Aging: A Look Back. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 397: 377-383.
- ⌘ **Kervella G, Laenneg Medisin y Al Liamm Brest.** 1985. Embannet gant skoazell Skol-Uhel ar Vro, 206.
- ⌘ **Khew-Goodall Y, Butcher CM, Litwin MS y cols.** 1996. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood.* 87(4): 1432-8.
- ⌘ **Kim YI.** 2004. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr* 80: 1123-1128.
- ⌘ **Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ y Ananthanarayanan M.** 2002. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca^{2+} -dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology.* 122: 1941-1953.
- ⌘ **Kishimata T.** 1989. The biology of Interleukin-6. *Blood.* 74: 1-10.

-
- ⊗ **Kitada T, Seki S, Iwai S, Yamada T, Sakaguchi H y Wakasa K.** 2001. In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J. Hepatology.* 35(5): 613-8.
 - ⊗ **Kitchen S y McCraw A.** 1998. Diagnóstico de la Hemofilia y otros trastornos de la coagulación. Manual de Laboratorio.
 - ⊗ **Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B y Stoll G.** 2007. Targeting platelets in Acute Experimental Stroke. Impact of glycoprotein Ib, VI and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation.* 115(17): 2323-30.
 - ⊗ **Klipstein FA y Lindenbaum J.** 1965. Folate Deficiency in Chronic liver disease. *J. Blood.* 25: 443-455.
 - ⊗ **Kountouras J, Billing Bh y Scheuer PJ.** 1984. Prolongated bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 65: 305-311.
 - ⊗ **Krahenbuhl S, Talos C y Reichen J.** 1994. Mechanisms of impaired hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology.* 19(5): 1272-81.
 - ⊗ **Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V y Pohl U.** 2002. NAD(P)H-oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 100:917-924.
 - ⊗ **Kronke NI, Schutze, Scheurich P y Ptizenmaier K.** 1992. TNF signal transduction and TNF-responsive genes. In Tumor Necrosis Factors. Structure, Function and Mechanism of Action. *Marcel Dekker. Inc. NY.* 189-216.
 - ⊗ **Laffi G, Cominelli F, Ruggiero M, Fedi S, Chiarugi VP, La Villa G y cols.** 1988. Altered platelet function in cirrhosis of the liver: impairment of inositol lipid and arachidonic acid metabolism in response to agonists. *Hepatology.* 8: 1620-1626.
 - ⊗ **Laffi G, Marra F, Failli P y cols.** 1993. Defective signal transduction in platelets from cirrhotics is associated with increased cyclic nucleotides. *Gastroenterology* 105: 148-156.
 - ⊗ **Laffi G, Cinotti S, Filimberti E, y cols.** 1996. Defective aggregation in cirrhosis is independent of in vivo platelet activation. *J. Hepatol.* 24: 436-43.
 - ⊗ **Lang C, Berardi S, Schafer M, Serra D, Hegardt FG, Krahenbuhl L y Krahenbuhl S.** 2002. Impaired ketogenesis is a major mechanism for disturbed hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term cholestasis and after relief of biliary obstruction. *J. Hepatology.* 37(5): 564-71.
 - ⊗ **Lang C, Schafer M, Serra D, Hegardt F, Krahenbuhl L y Krahenbuhl S.** 2001. Impaired hepatic fatty acid oxidation in rats with short-term cholestasis: characterization and mechanism. *J. Lipid Res.* 42(1): 22-30.
 - ⊗ **Lau BW, Colella M, Ruder WC, Ranieri M, Curci S y Hofer AM.** 2005. Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca²⁺ entry at plasma membrane. *Gastroenterology.* 128(3): 695-707.
 - ⊗ **Lanser ME y Brown GE.** 1989. Stimulation of rat hepatocyte fibronectin production by monocyte-conditioned medium is due to interleukin 6. *Exp Med.* 170: 1781-6.



- ⌘ **Le Bras M, Clément MV, Pervaiz S y Brenner C.** 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Hystology and Hystiphatology*. 20: 205-220.
- ⌘ **Lee H, Kim JM, Kim HJ, Lee I y Chang N.** 2004. Folic Acid Supplementation can reduce the endothelial damage. *The Journal of Nutrition*. 135: 544-548.
- ⌘ **Lee HC y Aarhus R.** 1995. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol Chem*. 270: 2152–2157.
- ⌘ **Lejas Petisco AI.** Papel de la vía de las Tirosinas Cinasas en el páncreas exocrino. Tesis Doctoral. *Fac. de Veterinaria.Univ.Extremadura*. 22-76. 1998.
- ⌘ **Lentz SR, Rodionov RN y Dayal S.** 2003. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl*. 4:61-5.
- ⌘ **Lentz SR.** 2005. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal Thromb Haemost*. 3(8): 1646-1654.
- ⌘ **León OS, Martínez G, García I, Bilbao T, Ledesma L.** 2004. Balanc Antioxidante/Prooxidante: Salud y Enfermedad. 1ra. Ed.
- ⌘ **Leoncini G, Bruzzese D y Signorello MG.** 2007. A role for PLC γ 2 in platelet activation by homocysteine. *Journal of Cellular Biochemistry*. 100 (5), 1255–1265.
- ⌘ **Leoncini G, Pascale R y Signorello MG.** 2003. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. *Eur. Journal. Clinnic Investigation*. 33(8): 713-719.
- ⌘ **Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM y Malinow MR.** 1996. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocysteinaemia. *J Clin nvest*. 98: 24-29.
- ⌘ **Leung L y Nachman R.** 1986. Molecular mechanisms of platelet aggregation. *Annu Rev Med*. 37: 179-86.
- ⌘ **Lin J, Ziring D, Desai S y cols.** 2008. TNF-alpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol*. 126(1):13-30.
- ⌘ **Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Xi Zhu M, Armstrong D y Birnbaumer L.** 2008. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *PNAS*. (105) 8: 2895–2900.
- ⌘ **Lindmark E, Tenno T y Siegbahn A.** 2000. Role of Platelet P-Selectin and CD40 Ligand in the Induction of Monocytic Tissue Factor Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20: 2322.
- ⌘ **Llorca Escuín I.** 1998. Hiperhomocisteinemia: Nuevo marcador de riesgo vascular. *Servicio de Análisis Clínico*. Hospital Vega Baja. Murcia-España.
- ⌘ **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Matthew P, Zipursky S y Darnell J.** 2005. Molecular Cell Biology. 5ª Ed. Edit. Panamericana. 286-291p.
- ⌘ **Look MP, Riezler R, ReicheC, Brensing KA, Rockstroh JK, Stabler SP, Spengler U, Berthold HK y Sauerbruch T.** 2000. Is the increase in serum cystathionine levels in

patients with liver cirrhosis a consequence of impaired homocysteine transsulfuration at the level of gamma-cystathionase? *Journal Gastroenterol.* 35(8): 866-872.

- ⊗ **López Novoa JM y Montañés I.** 2001. Mecanismos responsables de la vasodilatación periférica en la cirrosis hepática. *Nefrología.* Vol. XXI: 24-32.
- ⊗ **López JJ, Camello-Almaraz C, Pariente JA y cols.** 2005. Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺ and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *Biochem J.* 390:243–252.
- ⊗ **López JJ, Redondo PC, Salido GM y cols.** 2006. Two distinct Ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Signal.* 18: 373–381.
- ⊗ **López J y Rodríguez JC.** Hemostasia en la hepatopatía. En: *SEMICYUC, Medicina Crítica Práctica.* Madrid. 2008. 91-100.
- ⊗ **Lorenzon P, Vecile E, Nadon E y cols.** 1998. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular endothelial cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J. Cell Biol.* 142: 1381–1391.
- ⊗ **Loscalzo J.** 1996. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin Invest.* 98: 5-7.
- ⊗ **Loscalzo J.** 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 88: 756–762.
- ⊗ **Luna ES.** Estudio de la interleuquina 6 sobre la síntesis de colágeno y de sus mecanismos de acción, en cultivos de lipocitos. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid. Facultad de Medicina. 1995.
- ⊗ **Lorente MA y Horta A.** 1991. “Técnicas de caracterización de polímeros “. UNED. Madrid.
- ⊗ **Ma HT, Venkatachalam K, Li HS, Montell C, Kuroski T, Patterson RL y Gill DL.** 2001. Assessment of the Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the Activation of Transient Receptor Potential Channels and Store-operated Ca²⁺ Entry Channels. *Journal Biology Chemistry.* 276: 18888-18896.
- ⊗ **MaCLennan DH.** 1970. Purification and properties of and adenosine triphosphatase from sarcoplásmico reticulum. *J. Biol. Chem.* 245, 4508-4518.
- ⊗ **Malinow MR, Duell PB, Williams MA, Kruger WD, Evans AA y Anderson PH.** 2002. Short term folic acid supplementation induces variable and paradoxical changes in plasma homocyst(e)ine concentrations. *Lipids.* 36: S27–S32.
- ⊗ **Mann KG, Butenas S y Brummel K.** 2003. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 17-25.
- ⊗ **Manna SK y Aggarwal BB.** 1998. IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor-kB, activation protein-1, and apoptosis. *J Immunol.* 161: 2863-72.
- ⊗ **Mao CK, Almenoff JS, Rudner XL, Kearney DM y Kindman LA.** 1996. Molecular cloning and characterization of SCAMPER, a sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci.* 93, 1993–1996.



- ⌘ **Marcus AJ y Safier LB.** 1993. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 7: 516-22.
- ⌘ **Marcus AJ, Silk ST, Safier LB y Ullman HL.** 1977. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J. Clin Invest.* 59: 149-158.
- ⌘ **Marecos EA.** 2000. Cirrosis. Revista de Posgrado de la Cátedra VIa Medicina-Facultad de Medicina.
- ⌘ **Martínez Murillo C.** 2003. Bases de la hemostasia y trombosis. *Gac. Méd Mex.* 139: 28-68.
- ⌘ **Martínez-Murillo C.** 2006. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev. Med. Inst. Mex.* 44: 51-58.
- ⌘ **Marsillach J, Ferré N, Camps J, Riu F, Rull A y Joven J.** 2008. Moderately High Folic Acid Supplementation Exacerbates Experimentally Induced Liver Fibrosis in Rats *Experimental Biology and Medicine* 2008, 233: 38-47.
- ⌘ **Martínez-Prieto C, Ortiz MC, Fortepiani LA, Atucha NM, García-Estañ J.** 2000. Hemodynamic and renal evolution of the bile duct ligated rat. *Clin. Sci.* 98: 611-617.
- ⌘ **Mates JM, Pérez-Gomez C, Nunez CI.** 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* 32.
- ⌘ **Mauviel A, Heino, Kahari VM, Hartmann DJ, Loyau O, Pujol JP y Vuorio E.** 1991. Comparativ effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *Invest. Dermatol.* 96: 243-249.
- ⌘ **Mc Carty MF.** 2004. Coping with endothelial superoxide: potential complementarity of arginine and high dose folate. *Med. Hypotheses.* 63(4): 709-718.
- ⌘ **McEver RP y Cummings RD.** 1997. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin Invest.* 100 (11): S97-S103.
- ⌘ **McEver RP.** 2001. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost.* 86(3): 746-756.
- ⌘ **McGill JM y Kwiatkowski AP.** 1998. Cholestatic liver diseases in adults. *Am J. Gastroenterol.* 93(5): 684-91.
- ⌘ **McPhee SA, Papadakis M y Tierney M.** 2007. Current Medical Diagnosis and treatment. 46ª Edicion. Ed. MacGrawHill.
- ⌘ **McPherson PS y Campbell KP.** 1993. The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Biol Chem.* 268, 13765-13768.
- ⌘ **McVeigh GE, Hamilton P, Wilson M, Hanratty CG, Leahey WJ, Devine AB, Morgan DG, Dixon LJ y McGrath LT.** 2002. Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate. *Circulation.* 106: 208-213.
- ⌘ **Medina E y Kaempffer A.** 2002. Cirrosis hepática en Chile. Revista Chilena de Salud Pública. 6 (1): 3.

-
- ⊗ **Meinrad Gawaz MD, Neumann FJ, Timm Dickfel MD, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Dieter Neumeier MD, Schömig A y Brand K.** 1998. Activated Platelets Induce Monocyte Chemotactic Protein-1 Secretion and Surface Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Endothelial Cells. *Circulation*. 98: 1164-1171.
 - ⊗ **Menéndez Cabezas A y Fernandez-Britto J.** 1999. Metabolismo de la Homocisteína y su relación con la Aterosclerosis. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 18: 155-168.
 - ⊗ **Mandel H, Brenner B, Berant M, et al.**1996. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden - effect on thrombosis. *N Engl J Med.* 334: 763-8.
 - ⊗ **Merten M y Thiagarajan P.** 2000. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 102: 1931-1936.
 - ⊗ **MertenM, Chow T, Hellums JD y cols.** 2000. A new role for P-selectin in shear induced platelet aggregation. *Circulation*. 102: 2045-2050.
 - ⊗ **MeSH.** 2010. Cell Adhesion Molecules. National Library of Medicin.
 - ⊗ **Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO y Stein H.** 1990. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*. 98(1): 175-84.
 - ⊗ **Minamino T, Kitakaze M y Sanada S y cols.** 1998. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation*. 98(17): 1721-7.
 - ⊗ **Mohammad RE, Sadeghipour H, Mehdi Dehghani, Kiani S, Payabvash S, Riazi S, Honar H, Pasalar P, Mirazi N, Amanlou M, Farsam H y Dehpour AR.** 2005. Homocysteine alterations in experimental cholestasis and its subsequent cirrhosis. *Life Science*. 76(21): 2497-512.
 - ⊗ **Monte MJ, Marin JJ, Antelo A y cols.** 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 15: 804-16.
 - ⊗ **Mohan IV, Jagroop IA, Mikhailidis DP y Stansby GP.** 2008. Homocysteine activates platelets in vitro. *Clin Appl Thromb Hemost*. 14(1): 8-18.
 - ⊗ **Irwin V, Mohan I, Jagroop A, Dimitri J, Mikhailidis P y Gerard P.** 2008. Stans by Homocysteine Activates Platelets *In Vitro*. *Clin Appl Thromb Hemost*. 14: 8.
 - ⊗ **Marsillach J, Ferré N, Camps J, Riu F, Rull A y Joven J.** 2008. Moderately High Folic Acid Supplementation Exacerbates Experimentally Induced Liver Fibrosis in Rats. *Experimental Biology and Medicine*. 233: 38-47
 - ⊗ **Moller C y Zielinski C.** 1992. Interleukin-6 production by peripheral blood monocytes in patients with chronic liver disease and acute viral hepatitis. *J. Hepatol*. 15: 372-7.
 - ⊗ **Moncada S y Vane JR.** 1979. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin, endoperoxides, tromboxan A2, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 30: 293-331.
 - ⊗ **Montalto P, Vlachogiannakos J, Cox DJ y cols.** 2002. Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *J. Hepatol*. 37: 463-70.



- ⌘ **Monteiro MC, O'Connor JE y Martínez M.** 2001. Aspectos Estructurales y Funcionales de las plaquetas. *Rev. Diagnostico Biológico.* 50(3): 1-32.
- ⌘ **Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, Freund M, Santer M, Kahn M, Nieswandt B, Gachet C, Cazenave JP y Lanza F.** 2001. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood.* 98: 1038-1046.
- ⌘ **Mukherjee S, Dola D, Maitrayee M, Asankur SD y Chandan M.** 2005. Synergistic effect of folic acid and Vitamin B₁₂ in ameliorating ardenic-induced oxidative damage in pancreatic tissue of rat. *The Journal of Nutricional Biochemistry.* Vol. 17: 319-327.
- ⌘ **Mulvihill JB y Foley P.** 2002. Crean and Walsh Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Ireland. European Heart Journal.* 23: 1569-1574.
- ⌘ **Mungrue IN, Stewart DJ y Husain M.** 2003. The Janus faces of iNOS. *Circ Res.* 3; 93(7): e74.
- ⌘ **Muraguchi A, Kishimata T, Miki Y y cols.** 1981. T cell-replacing factor-(TRF) induced secretion in a human E blastoid cell and demostration of acceptors for TRF. *J. Immunol.* 127: 412.
- ⌘ **Nakajima T, Okuda Y, Chisaki K y cols.** 2000. Bile acids increase intracellular Ca²⁺ concentration and nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 130: 1457-1467.
- ⌘ **Nalan J.** 1989. Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury-An idea whose time has come again. *Hepatotogy.* 10: 887-91.
- ⌘ **Newman PJ.** Platelet GPIIb-IIIa: molecular variations and alloantigens. *Thromb Haemost.* 66: 111-8.
- ⌘ **Nieswandt B, Brakebush C, Bergmerier W, Shulte V, Bouvard D y Moktar R.** 2001. Glycoprotein VI but not $\alpha 2$, $\beta 1$ integrin is assencial for platelet interaction with collagen. *Journal EMBO.* 1: 2120-2130.
- ⌘ **Northup PG, McMahan MM, Ruhl AP, Altschuler SE, Volk-Bednarz A, Caldwell SH y cols.** 2006. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thrombosis. *Am J Gastroenterol.* 101: 1524-8.
- ⌘ **Nuño-Ayala M, Carnicer R, Guzmán MA, Guillén N, Navarro MA, Arnal C y Osada J.** 2010. Hiperhomocisteinemia. Panorama actual y contribución del ratón a su estudio Publicado en *Clin Invest Arterioscl.* 22 (05); 22: 200-19.
- ⌘ **Ogasawara F, Fusegawa H, Haruki Y, Shiraishi K, Watanabe N y Matsuzaki S.** 2005. Platelet activation in patients with alcoholic liver disease. *Tokai J Exp Clin Med.* 30:41-48.
- ⌘ **Ohzata H, Yashizaki K, Nishimata N y cols.** 1992. Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: Detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgen.* 111: 201-9.
- ⌘ **Okatani Y, Wakatsuki A y Reiter RJ.** 2001. Melatonin counteracts Potentiation by Homocystein of KC-Induced Vasoconstriction in Human Umbilical Artery: Relation to calcium Influx. *Biochimical Biophysical Research Communication.* 280: 940-944.

-
- ⌘ **Oleksowicz L, Mrowiec Z, Isaacs R, Dutcher JP y Puszkin E.** 1995. Morphologic and ultrastructural evidence of interleukin-6 induced platelet activation. *Am J Hematol.* 48(2):92-9.
 - ⌘ **Ordinas A, Escolar G, Cirera I y cols.** 1996. Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions. *Hepatology.* 24: 1137.
 - ⌘ **Organización Mundial de la Salud (OMS).** 2010.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/index.html>
http://www.portalesmedicos.com/noticias/dia_mundial_hepatitis_080532.htm
<http://www.who.int/healthinfo/morttables/en/index.html>
 - ⌘ **Organización Mundial de la Salud (OMS).** 2011.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/es/index.htm>
 - ⌘ **Ortiz MC.** Alteraciones de la Función Renal en la Cirrosis Hepática experimental: Papel del Óxido Nítrico. Tesis Doctoral. Fac. Medicina-Murcia.3-13p. 1998.
 - ⌘ **Ozawa K, Tanaka J, Ukigusa M, Kimura K y Tobe T.** 1979. Early metabolic disturbances in the liver following unilateral hepatic or common bile duct obstruction in rabbits. *Eur Surg Res.* 11(1): 61-70.
 - ⌘ **Ozawa T.** 1999. Ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism of rat pancreatic acinar cells is modulated by calmodulin. *Biochim Biophys Acta.* 1452(3): 254-62.
 - ⌘ **Pacchiarini L, Tua A y Grignani G.** 1996. In vitro effect of reduced glutathione on platelet function. *Haematologica.* 81:497-502.
 - ⌘ **Palareti G, Legnani C, Maccaferri M y cols.** 1991. Coagulation and fibrinolysis in orthotopic liver transplantation. *Haemostasis* 21: 68-76.
 - ⌘ **Panasiuk A, Zak J, Kasprzycka E, Janicka K y Prokopowicz D.** 2005. Blood platelet and monocyte activations and relation to stages of liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology.* 11(18): 2754-2758.
 - ⌘ **Parés A.** 2008. Historia natural de la cirrosis biliar primaria. Unidad de Hepatología. *Hospital Clínic. Gastroenterol Hepatol.* 31(8): 500-7.
 - ⌘ **Parés A, Caballeria L y Rodes J.** 2006. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology.* 130: 715-720.
 - ⌘ **Patel S, Marchant J y Brailoiu E.** 2011. Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell Calcium.* 47(6): 480-490.
 - ⌘ **Patel SR, Hartwig JH y Italiano JE.** 2005. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal Clinic Investigation.* Vol. 115: 3348-3354.
 - ⌘ **Palareti G, Legnani C, Maccaferri M, y cols.** 1991. Coagulation and fibrinolysis in orthotopic liver transplantation: role of the recipient's disease and use of antithrombin III concentrates. S. orsolaworking group on liver transplantation. *Haemostasis.* 21: 68-76.
 - ⌘ **Peck-Radosavljevic M.** 2000. Thrombocytopenia in liver disease. *J.Gastroenterol.* 14(D): 60D-6D.



- ⌘ **Pereira J.** 2006. Papel de las plaquetas en la aterotrombosis y mecanismos de acción de las drogas antiplaquetarias. *Rev. Chilena de Cardiología.* 25: 301-310.
- ⌘ **Perez Fernandez T, Lopez Serrano P, Tomas E, Gutierrez ML, Lledo JL, Cacho G, Santander C y Fernandez Rodriguez CM.** 2004. Diagnostic and therapeutic approach to cholestatic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 96(1): 60-73.
- ⌘ **Pérez-Gómez F y Bover R.** 2007. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Rev. Esp. Cardiol.* 60: 1217-9.
- ⌘ **Perón JM, Menéndez López JR y Trujillo López Y.** 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 30(1): 36-44.
- ⌘ **Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM y Shaper AG.** 1995. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged. *British men. Lancet.* 346: 1395-8.
- ⌘ **Pfister SL.** 2004. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension.* 43: 428-33.
- ⌘ **Philipson KD, Nicoll DA, Ottolia M, Quednau BD, Reuter H, John S y cols.** 2002. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. *Ann NY Acad Sci.* 976: 1-10.
- ⌘ **Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM y Violi F.** 2003. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover platelet function, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: H41-H48.
- ⌘ **Pihusch R, Rank A, Gohring P y cols.** 2002. Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease. *J. Hepatol.* 37: 548-555.
- ⌘ **Pinsky MH, Vincent JI, Deviere J y cols.** 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. *Chemistry.* 103: 565-75.
- ⌘ **Pinton P, Tsuboi T, Ainscow EK, Pozzan T, Rizzuto R y Rutter GA.** 2002. Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase C beta II in living pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem.* 277:37702-37710.
- ⌘ **Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA y cols.** 2010. P-Selectin-Mediated Platelet-Neutrophil Aggregate Formation Activates Neutrophils in Mouse and Human Sickle Cell Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 30:2392.
- ⌘ **Poupon R.** 2010. Primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* 52: 745-758.
- ⌘ **Pratico D, Pasin M, Barry OP, Ghiselli A, Sabatino G, Iuliano L, Fitzgerald GA y Violi F.** 1999. Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation.* 99: 3118-3124.
- ⌘ **Pujol-Moix N y Escolar G.** 2001. Morfología y Estructura de las plaquetas. *Servicio de hepatología Hospital de la Santa Creu y Sant Pau.* pag.: 23-39.
- ⌘ **Putney JW.** 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7(1): 1-12.
- ⌘ **Pusl T y Beuers U.** 2006. Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol.* 12: 3487-95.

-
- ⌘ **Rabie T, Strehl A, Ludwing A y nieswand B.** 2005. Evidence for role of ADAM17 (TACE) in the Regulation of Platelet Glycoprotein V. *Biol Chem.* 280: 14462-14468.
 - ⌘ **Radi R, Cassina A y Hodara R.** 2002. Nitric oxide and peroxyxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem.* 838: 401-409.
 - ⌘ **Ramírez P, Marín JM, Piñero A, Chávez-Cartaya R y Parrilla P.** 2000. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp.* 67:3; 67: 281-91.
 - ⌘ **Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G y cols.** 2003. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann Intern Med.* 139: 186-93.
 - ⌘ **Real Decreto 1201/2005,** de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *BOE número 252/2005* de 21-10-2005, 34367-91.
 - ⌘ **Redondo Liberal PC.** 2004. Estudio de la Entrada Capacitativa de Calcio (ECC) en Plaquetas Humanas. Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno. *Tesis de doctorado. Univ. Extremadura.* 3-166.
 - ⌘ **Redondo PC, Salido GM, Pariente JA y Rosado JA.** 2004. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochemistry Pharmacology.* 67(6): 1065-1076.
 - ⌘ **Redondo PC, Jardin I, Lopez JJ, Salido GM y Rosado A.** 2008. Intracellular Ca²⁺ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP3 receptor and SERCA3 in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1783: 1163-1176.
 - ⌘ **Regañon E, Aznar J y Vila V.** 1985. Interacción del fibrinógeno con las plaquetas. *Sangre.* 30: 449-57.
 - ⌘ **Regland y cols.** 1995. Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J. Neural Trans.* 100: 1391-98.
 - ⌘ **Rehm J, Patra J, Baliunas D, Popova S, Roerecke M y Taylor B.** 2002. Alcohol consumption and the global burden of disease. Ginebra: OMS. Departamento de Salud Mental y Abuso de Sustancias.
 - ⌘ **Riba R, Nicolaou A, Troxler M, Homer-Vaniasinkam S y Naseem KM.** 2004. Altered platelet reactivity in peripheral vascular disease complicated with elevated plasma homocysteine levels. Elevated plasma concentrations of the sulphur-containing amino acid homocysteine. *Atherosclerosis.* 175(1): 69-75.
 - ⌘ **Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH y Italiano JE.** 2005. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Journal Blood.* 106: 4066-4075.
 - ⌘ **Richter S, Mücke I, Menger MD y Vollmar B.** 2000. Impact of intrinsic blood flow regulation in cirrhosis: maintenance of hepatic arterial buffer response. *American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiol.* Vol. 279: 454-264.



- ⌘ **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ.** 1997. Interrelation of hyperhomocysteinemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation*. 95: 1777-1782.
- ⌘ **Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY y Hoffman M.** 1998. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*. 4: 331-34.
- ⌘ **Robbins y Cotran.** 2009. Haemodynamic diseases. Pathologic Basis of Disease 8th Ed. (Elsevier).
- ⌘ **Rodés J, Benhamou JP, Bircher J, McIntype N y Rizzetto M.** 2001. Tratado de Hepatología Clínica. Tomo II, Segunda Ed. Ed. Masson.
- ⌘ **Rodgers GM y Conn MT.** 1990. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 75: 895-901.
- ⌘ **Rodgers GM y Kane WH.** 1986. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J. Clin Invest*. 77: 1909-16.
- ⌘ **Rodriguez-Garay EA.** 2003. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol*. 2(4): 150-8.
- ⌘ **Rodriguez J, Ronald E, Maloney, Rassaf T, Nathan SB y Feelisch M.** 2003. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *PNAS*. 100: 336-341.
- ⌘ **Rodriguez-Pérez F, Isales CM y Groszmann RJ.** 1993. Platelet cytosolic calcium, peripheral hemodynamics and vasodilatory peptides in liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 105: 863-867.
- ⌘ **Rosado JA, Pariente JA, Salido GS y Redondo PC.** 2010. SERCA2b Activity is Regulated by Cyclophilins in Human Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30: 419-425.
- ⌘ **Rosado JA, Redondo PC, Pariente JA y Salido JM.** 2004. Calcium signalling and tumorigenesis. *Cancer Therapy*. 2: 263-270.
- ⌘ **Rosado JA & Sage SO.** 2002. Platelet signalling: calcium. En: Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics. Cambridge University Press, Cambridge. 260-271.
- ⌘ **Rosado JA, Lopez JJ, Harper MT, Redondo PC, Pariente JA, Salido GM y Sage SO.** 2004. Two pathways for stored-mediated calcium entry differentially modulated by the actin cytoskeleton in human platelets. *Journal Biology Chemistry*. 179: 29231-29235.
- ⌘ **Ross R.** 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 138: S419-20.
- ⌘ **Ross y Pawlina.** 2007. Histología. 5ª Edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 124-127.
- ⌘ **Ryden M y Arner P.** 2007. Tumor necrosis factor-alpha in human adipose tissue—from signalling mechanisms to clinical implications. *J. Intern Med*. 262(4): 431-8.
- ⌘ **Sabroe Ebbesen L y Ingerslev J.** 2005. Folate deficiency-induced hyperhomocysteinemia attenuates, and folic acid supplementation restores, the functional activities of rat coagulation factors XII, X, and II. *Journal Nutritional*. 135: 1836-1840.

-
- ⊗ **Sabroen Ebbese L, Christiansen K y Ingerslev J.** 2003. Hyperhomocysteinemia due to folate deficiency is thrombogenic in rats. *Journal Nutritional.* 133(7): 2250-2255.
 - ⊗ **Sagara Y, Fernandez-Belda F, de Meis L y Inesi G.** 1992. Characterization of the inhibition of intracellular Ca^{2+} transport ATPases by thapsigargin. *J. Biol Chem.* 267: 12606-12613.
 - ⊗ **Salido GM, Jardin I y Rosado J A.** 2011. The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv Exp Med Biol.* 704: 413-433.
 - ⊗ **Salvador JM, Inesi G, Rigaud JL y Mata AM.** 1998. Ca^{2+} transport by reconstituted synaptosomal ATPase is associated with H^{+} countertransport and net charge displacement. *J. Biol Chem.* 273: 18230-18234.
 - ⊗ **Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM y Vane JR.** 1989. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol.* 97: 1145–1150.
 - ⊗ **Sánchez C, Planells E, Aranda P, Pérez de la Cruz A, Asensio C, J. Mataix J y Llopis J.** 2007. Vitamin B complex and homocysteine in chronic renal failure. *Nutr. Hosp.* 22 (6).
 - ⊗ **Salzman EW y Ware JA.** 1989. Ionized calcium as an intracellular messenger in blood platelets. *Programe Hemost Thromb.* Vol. 9: 177-202.
 - ⊗ **Shapiro AD.** 1999. Trastornos de la Función Plaquetaria. *Federación Mundial de la hemofilia.* N°19.
 - ⊗ **Sharathkumar AA y Shapiro AD.** 2008. Trastornos de la función plaquetaria. Segunda edición. World Federation of Hemophilia.
 - ⊗ **Suzuki T y Takano S.** 1980. Effect of Bile on Aggregation and Morphology of Rabbit Platelets. *Tohoku J exp. Med.* 131, 71-78.
 - ⊗ **Sayed D, Nabila F, Amin B, Ghada M y Galal.** 2010. Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis. *Thrombosis Research.* (125) e228–e233.
 - ⊗ **Schiff ER, Sorrel MF y Maddrey.** 2007. Diseases of the Liver. Vol 2. 10ª Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilking.
 - ⊗ **Schiffrin EL.** 2002. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *AMJ Hypertens.* 15:115S-122S.
 - ⊗ **Seegmiller A y Ravindra Sarode.** 2007. Laboratory Evaluation of platelet function. *Hematol Oncol Clin N Am.* 21: 731-742.
 - ⊗ **Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D y Rosenberg IH.** 1993. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 270:2693-8.
 - ⊗ **Semenov AV, Romanov YA, Loktionova SA y cols.** 1999. Production of soluble P-selectin by platelets and endothelial cells. *Biochemistry (Mosc).* 64(11): 1326–35.



- ⌘ **Sepúlveda Justo MR.** Analisis de la localización de bombas de calcio y de sus isoformas en cerebro adulto y en desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura Badajoz. 2006.
- ⌘ **Serebruany VL y Gurbel PA.** 1999. Assessment of platelet activity by measuring platelet derived substances in plasma from patients with acute myocardial infarction: Surprising lessons from the GUSTO-III platelet study. *Thromb Res.* 93: 149–150.
- ⌘ **Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Vina J y Sastre J.** 2004. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology.* 39(3): 711-20.
- ⌘ **Sevanian A y Ursini F.** 2000. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 306–311.
- ⌘ **Simonian NA y Coyle JT.** 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 36: 83-106.
- ⌘ **Singh, I.** 1997. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol Cell Biochem.* 167, 1-29.
- ⌘ **Singh, I.** 2002. Peroxisomal fatty acid oxidation and cellular redox. *Methods Enzymol.* 352: 361-72.
- ⌘ **Shiao YJ, Chen JC, Wang CN y Wang CT.** 1993. The mode of action of primary bile salts on human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1146(2): 282-93.
- ⌘ **Signorello MG, Pascale R y Leoncini G.** 2002. Effects of HCY on arachidonic acid release in human platelets. *Eur J. Clin Invest.* 32:279-284.
- ⌘ **Sohal RS, Sohal BH y Orr WC.** 1995. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage and longevity in different species of flies. *Free Radic Biol Med.* 19: 499-504.
- ⌘ **Sokol RJ, Winkhofer-Roob BM, Devereaux MW y McKim JM.** 1995. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology.* 109(4): 1249-56.
- ⌘ **Soria Aledo A.** 2009. Estudios de polimorfismos genéticos TNF-alfa (238 Y 308), IL-10 (1082) MTHFR (677) y del DAS-28, como predictores de la respuesta al tratamiento con infliximab, en la artritis reumática. Servei de Publicacions Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Univ. De Valencia.
- ⌘ **Southorn PA y Powis G.** 1988. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic. Proc.* 63: 381-389.
- ⌘ **Sogo N, Campanella C, Webb DJ y Megson IL.** 2000. S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Br J Pharmacol* 131: 1236–1244.
- ⌘ **Spertinio, Cordey AS, Monai N y cols.** 1996. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol.* 135 (2): 523–531.

-
- ⌘ **Stanarius A, Toè Pel I, Schulz S, Noack H y Wolf G.** 1997. Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem.* 99: 411-429.
 - ⌘ **Stampfer JS, Osborne JA, Jakari O y cols.** 1993. Adverse effects of HCY are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* 1993; 91:308-318.
 - ⌘ **Stratton RJ y Smith TR.** 2006. Role of enteral and parenteral nutrition in the patient with gastrointestinal and liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 20:441-466.
 - ⌘ **Suárez García I, Gómez Cerezo JF, Ríos Blanco JJ, Barbado FJ, Hernández JJ y Vázquez Rodríguez.** 2001. La homocisteína. ¿El factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio? *Anales de Medicina Interna. Hospital Universitario La Paz. Madrid.* 18(4): 211-217.
 - ⌘ **Suliman ME, Lindholm B, Barany P y cols.** 2001. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to nutritional status and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 39(8): 734-738.
 - ⌘ **Rodríguez R.** 2010. Diseño y construcción de un sensor de permeabilidad de oxígeno en membranas mediante fluorescencia. Dpto. Ciencia e Ingeniería de Materiales. Univ. Carlos III de Madrid.
 - ⌘ **Rubin MH, Weston MJ, Langley P y cols.** 1979. Platelet function in chronic liver disease: Relationship to disease severity. *Dig Dis Sci.* 24: 197.
 - ⌘ **Symon FA, Lawrence MB, Williamson ML y cols.** 1996. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. *J Immunol.* 157(4): 1711-1719.
 - ⌘ **Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Path D y Burroughs Ak.** 2005. Infection, coagulation and visceral bleeding in cirrhosis. *Gut.* 54: 556-63.
 - ⌘ **Tada M, Kirchberger MA, Repke DI y Katz AM.** 1974. La estimulación del transporte de calcio en el retículo sarcoplasmático cardíaco por la adenosina 3':5'-monofosfato proteína quinasa dependiente. *J. Biol Chem.* 10 (19): 6174-80.
 - ⌘ **Tan J, Reddy E, Murphy D, Keely S, O'Neill S, Tan et al.** 2012. Bile acids differentially impact on platelet Activation. *BMC Proceedings* (4): P22
 - ⌘ **Tanaka A, Feng Z, Inomoto T, Mori S, Tokuka A, Shinohara H, Kataoka M, Yamaoka Y y Ozawa K.** 1995. Kinetic analysis of impaired work-cost performance in jaundiced rabbit liver. *Res Exp Med (Berl).* 195(2): 77-84.
 - ⌘ **Takano S y Suzuki T.** 1980. Effect of bile on aggregation and morphology of rabbit platelets. *Exp Med.* 131(1): 71-8.
 - ⌘ **Téllez-Avila FI, Chávez-Tapia NC y Torre-Delgadillo A.** 2007. Trastornos de coagulación en el cirrótico. *Rev Inv Clin.* 59 (2): 153-160.
 - ⌘ **Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D y Burroughs AK.** 2005. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut.* 54: 556-563.



- ⌘ **Thambyrajah J y Townend JN.** 2000. Homocysteine and atherothrombosis-mechanisms for injuri. *Journal European Herat.* 21: 967-974.
- ⌘ **Thannickal V y Fanburg BL.** 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: L1005–L1028.
- ⌘ **Tilg H, Wilmer A y Vagel W y cols.** 1992. Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology.* 103: 264-74.
- ⌘ **Torres Duarte AP, Dong QS, Young J, Abi-Younes S y Myers AK.** 1995. Inhibition of platelet aggregation in whole blood by alcohol. *Thromb Res.* 78: 107–15.
- ⌘ **Trejo-Solís C, Chagoya De Sánchez V, Aranda-Fraustro A, Sanchez-Sevilla L, Gómez-Ruiz C y Hernández-Muñoz R.** 2003. Inhibitory effect of vitamin e administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Lab. Investigation.* 83(11): 1669-1679.
- ⌘ **Trepakova E, Cohen RA y Bolotina VM.** 1999. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ. Res* 84: 201-209.
- ⌘ **Trottier, Białek A, Caron P, Robert J, Straka, Heathcote J, Milkiewicz P y Barbier O.** 2012. Metabolomic profiling of 17 bile acids in serum from patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: A pilot study. *Jocelyn Digestive and Liver Disease.* 44: 303–310.
- ⌘ **Tschoepe D, Schultheiss HP, Kolarov y cols.** 1993. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischaemic events after PTCA. *Circulation.* 88: 37–42.
- ⌘ **Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G y cols.** 2003. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: Role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 418-24.
- ⌘ **Upchurch GR, Welch GN y Loscalzo J.** 1996. HCY, ERDF and endothelial function. *J Nutr.* 126: 1290S-1294S.
- ⌘ **Vardareli E, Saricam T, Demirustu C y Gulbas Z.** 2007. Soluble P selectin levels in chronic liver disease: relationship to disease severity. *Hepatogastroenterology.* 54: 466–469.
- ⌘ **Varga-Szabo D, Authi K, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A y Nieswandt B.** 2008. Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Arch - Eur J Physiol.* 457: 377–387.
- ⌘ **Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH y Holmsen H.** 1994. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J. Biol Chem.* 269: 13874-9.
- ⌘ **Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR y Castilho RF.** 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep.* 17: 43-52.
- ⌘ **Villalobos C.** 2005. 20 años de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+} . *Boletín Informativo de fisiología.* 8 (1): 7-9.

-
- ∞ **Villalobos C. y García-Sancho J.** 1995. Capacitative Ca^{2+} entry contributes to the Ca^{2+} influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Pflügers Arch.* 430: 923-935.
 - ∞ **Vivek Kaul y Munoz SJ.** 2000. Coagulopathy of Liver Disease. Current treatment options in gastroenterology. *Current Science Inc.* 3 (6): 433-437.
 - ∞ **Vlahcevic ZR, Buhac I, Bell C y Leon Swell J.** 1970. Abnormal metabolism of secondary bile acids in patients with cirrhosis. *Gut.* 11: 420-422.
 - ∞ **Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM y Buczynski A.** 2002. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 13: 175-182.
 - ∞ **Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL y OK.** 2002. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: Role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1777-83.
 - ∞ **Watanabe M, Shiraishi K, Itakura M y Matsuzaki S.** 1998. Relationship between platelet membrane lipid compositions and platelet aggregability in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin.* 22(3): 97S-102S.
 - ∞ **Watkins Jennifer y BSc Hons.** 2010. Platelet Adhesion in Atherogenesis. Tesis de la Universidad de Wolverhampton-UK.
 - ∞ **Waud WR y Rajagopalan KV.** 1976. Purification and properties of the NAD^{+} dependent (Type D) and O_2 dependent (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 172: 354-364.
 - ∞ **Wei CL, Hon WM, Lee KH y Khoo HE.** 2005. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats. *Liver Int.* 25(3): 647-56.
 - ∞ **Wei CL, Hon WM, Lee KH y Khoo HE.** 2005. Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J. Gastroenterology.* 2; 11(3): 362-7.
 - ∞ **Wei CL, Khoo HE, Lee KH y Hon WM.** 2002. Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide.* 7(2): 91-102.
 - ∞ **Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J.** 2002. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 22: 34-41.
 - ∞ **Weiss N, Keller C, Hoffmann U y Loscalzo J.** 2002. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild Hyperhomocysteinemia *Vascular Medicine.* 7: 227-239.
 - ∞ **Weitz JI, Hirsh J y Samama MM.** 2008. New Antithrombotic Drugs. American College of ChestPhysicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest.* 133 Supl. 1:234-56.
 - ∞ **Weller A, Isenmann S y Vestweber D.** 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E-selectin and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol Chem.* 267 (21): 15176-83.



- ⌘ **Watson SP y Authi KS.** 1996. Platelets a Practical Approach. Ed. IRL PRESS at Oxford University Press. Pag. 1-85.
- ⌘ **White JG.** 1993. Functional significance of mobile receptors on human platelets *Arterioscler. Thromb. Vascular Biology.* 13: 1236-1243.
- ⌘ **Wiest R y Groszmann RJ.** 1999. Nitric oxide and portal hypertension: Its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis.* 19: 411-426.
- ⌘ **Wether J.** 2009. Schematic of a Spectofluometer.
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_a_Spectrofluorometer.jpg.
- ⌘ **Wotherspoon F, Laight DW, Browne DL, Turner C, Meeking DR, Allard SE, Munday LJ, Shaw KM y Cummings MH.** 2006. Plasma homocysteine, oxidative stress and endothelial function in patients with Type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria. *Diabet Med.* 23(12): 1350-1356.
- ⌘ **Yamaguchi F, Yoshimura Y, Nakazawa H y Ariga T.** 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by Electron Spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO System. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2544–2548.
- ⌘ **Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F y Igarashi Y.** 1996. Sphingosine 1-Phosphate Induces Platelet Activation through and Extracellular Action and Shares a Platelet Surface Receptor with Lysophosphatidic Acid. *The journal of biological chemistry.* 5291–5297.
- ⌘ **Yip HK, Lai SL, Lan MY, Chang WN, Liu JS, Kao YF, Chang YY, Lu CHsi, Chen WH, Lin HH y Liou ChW.** 2007. Time course of platelet activation and von Willebrand Factor in patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation after ischemic stroke. Evaluation of Prognostic Determinants. *J Circ.* 71: 321 –326.
- ⌘ **Yoshimura T, Sone y Ogura T.** 1990. Membrane perturbation as a possible cytotoxic mechanism of TNF and interferons. En *Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action. Role in Disease anca Therapy.* Basel. Karger. 70-76.
- ⌘ **Young PB, Kennedy S, Molloy AM, Scott JM, Weir DG, Kennedy DG.** 1997. Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinaemia in pigs. *Atherosclerosis.* 129: 67-71.
- ⌘ **Zambruni A, Thalheimer U, Coppell J y cols.** 2004. Endogenous heparin like activity detected by anti-Xa assay in infected cirrhotic and non-cirrhotic patients. *Scand J Gastroenterol.* 39: 830–6.
- ⌘ **Zelko IN, Mariani TJ y Folz RJ.** 2002. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology & Medicine.* 33(3): 337–349.
- ⌘ **Zimmermann H, Kurzen P, Klossner W, Renner EL y Marti U.** 1996. Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *J. Hepatol.* 25(4): 567-73.
- ⌘ **Zhou XJ, Vaziri ND, Wang XQ, Fred G, Silva FG y Laszik Z.** 2002. Notric oxide synthase expression in hypertension induced by inhibition of glutathione synthase. *J Pharma Exp. Ther.* 300: 762-767.
- ⌘ **Zhu M X, Evans AM, Ma J, Parrington J y Galione A.** 2010. Two-pore channels for integrative Ca²⁺ signaling. *Commun Integr Biol.* 3: 12-17.

-
- ⊗ **Zucker MB y Nachmias VT.** 2007. Platelet Activation. *Arteriosclerosis*. 5: 2-18.
 - ⊗ **Zufarov KA y Sadriddinov AF.** 1989. Ultra structural bases of intravascular thrombosis in the liver in mechanical jaundice. *Biol Med*. 107(3): 376-379.
 - ⊗ **Zumaeta Villena E, Navarrete Siancas J y Figueroa Barrios R.** 1998. Cirrosis Biliar Primaria: Relacion Clínico-Laboratorial y Patológica. *Rev. Enfermedades del Aparato Digestivo*. 1: 4-5.
 - ⊗ **Zuñiga VL, Bartolí R, Planas R, Alan y Hofmann F.** 2003. Oral Bile Acids Reduce Bacterial Overgrowth, Bacterial Translocation, and Endotoxemia in Cirrhotic Rats. *Hepatology*. 37: 551-557.
 - ⊗ <http://www.cnx.org/content/m34656/1.1/>
 - ⊗ <http://www.vi.cl/enfermedades-autoinmunes-capitulos-de-inmunologa-apuntes-entendiendo>.
 - ⊗ <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p414/a2007/&file=pca>
 - ⊗ <http://www.bd.com/videos/bdb/training/itf/overview/player.html>).
 - ⊗ http://www.portalesmedicos.com/noticias/dia_mundial_hepatitis_080532.htm

X

ANEXOS



1. REACTIVOS

1.1 Anestésicos

- **2-Imalgène 1000:** Clorhidrato de Ketamina (11,52 g) 10 g base, Clorbutol (500 mg), excipientes c.s.p. 100 mL como principio activo. Se guarda a 4 °C. Marca comercial Roche.
- **Rompun:** 1 mL contiene, p-hidroxibenzoato de metilo (1 mg) como conservante y Clorhidrato de Xilacina (20 mg) como principio activo. Se guarda a 4 °C. Marca comercial Bayer.

1.2 **Albúmina:** de suero Bovino. Se guarda a 4 °C. Marca comercial Sigma.

1.3 **ACG:** solución compuesta por una concentración final de:

- Citrato Sódico (80 mM)
- Ácido Cítrico (52 mM)
- Glucosa (180 mM)

Todo ello diluido en agua ultra pura, guardado a 4 °C. Marca comercial Sigma.

1.4 **Ácido Plurónico (20 % p/v):** se disuelven 100 mg de ácido plurónico en 500 µl de DMSO, se agita bien hasta que la mezcla sea homogénea. Se guarda a temperatura ambiente. Marca comercial Sigma.

1.5 **Ácido Fólico (0,06 g/L):** diluida en agua de grifo. Protegido de la luz. Se guarda a 4 °C. Marca comercial Sigma.

1.6 **Agonistas:** se utilizaron las siguientes drogas con sus respectivas concentraciones de trabajo:

- Adenosin-5'-Difosfato (ADP) (500 µM): diluida en agua ultra pura.
- Trombina (Tr) (1 U/10 µl): 100 unidades disueltas en 1mL de agua ultra pura.
- Tapsigargina (TG) (100 µM): diluida en agua ultra pura.
- 2,5-di-(ter-butyl)-1,4-benzohidroquinona (TBHQ)(20mM): diluida en DMSO
- L-Cisteína (1 mM): diluida en agua ultra pura.
- DL-Homocisteína (1 mM): diluida en agua ultra pura.
- Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (1 M): 113,3 µl H₂O₂ de diluida en 886,7 µl Tampón-2. Se guarda 4 °C.
- Tritón (10 X): diluida en agua ultra pura. Se guarda a T^a ambiente.

Salvo especificado, se guardan a -20 °C. Marca comercial Sigma.

-
- 1.7 **Apirasa (40 µg/mL):** 1 KU diluida en 7 mL de agua ultra pura para tener una concentración final. Marca comercial Sigma. Se guarda a -20 °C.
- 1.8 **Acido Desoxicólico (DC) (120 mM):** 25 mg diluido en 500 µl de Tampon-2. Se prepara al momento. Marca comercial Sigma.
- 1.9 **Ácido quenodesoxinucleico (CDC) (120 mM):** 25 mg diluido en 500 µl de Tampon-2. Se prepara al momento. Marca comercial Sigma.
- 1.10 **Anticuerpos:** Se reconstituyeron en 1 mL de agua ultra pura Se guarda a 4 °C. Marca comercial AbD Serotec.
- MOUSE ANTI RAT CD61-FITC (0,1 mg/mL)**
MOUSE ANTI-HUMAN CD62P-PE (0,1 mg/mL)
- 1.11 **DL-Buthionine(S-R)-Sulfoxamine (BSO):** 250 mg diluido en 5 mL de agua ultra pura. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.12 **CaCl₂·2H₂O (100 mM):** 147 mg diluido en 10mL agua ultra pura. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.13 **Citokinas:**
- **Interleuquina-6 (rat-IL-6) (20 µg/mL):** 20 µg diluida en 500 µl de agua ultra pura y 500 µl de PBS (1 % BSA). Se guarda a -20 °C. Marca comercial PeProtech.
 - **Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-α) (20 µg/mL):** 20 µg diluida en 500 µl de agua ultra-pura y 500 µl de PBS (1 % BSA). Se guarda a -20 °C. Marca comercial PeProtech.
- 1.14 **Citrato (3 %):** diluida en agua ultra pura. Se guarda a 4 °C en la oscuridad. Marca comercial Sigma.
- 1.15 **5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoreseina diacetato (CM-H₂DCFDA-acetil éster) (2,86 µg/µl):** 50 µg liofilizado, diluido en 17,5 µg de DMSO. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.16 **Dimetilsulfóxido (DMSO):** es un disolvente orgánico empleado para preparar compuestos no hidrosolubles como el fura-2AM, el ácido plurónico y otros. Se guarda a temperatura ambiente. Marca comercial Fluka.
- 1.17 **EDTA-K₃ (15 %):** diluida en agua ultra pura. Se guarda a 4 °C en la oscuridad. Marca comercial Sigma.



- 1.18 EGTA (20 mM):** se diluye 96 mg de EGTA en 10 mL de agua ultra pura y se ajusta el pH a 7,4. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.19 Etilen glicol bis (beta Aminoetil éter) N,N,N,N Ácido tetracético(EGTA-Tris) (4 M):** se diluye 475 mg de EGTA (Sigma) más 600 mg de TRIS (hidroximetil-amino metano (Merck) en 2,5 mL de agua ultra-pura, agitar bien, ajustar pH a 8.18 y guardar en alícuotas de 20 µl, a -20 °C.
- 1.20 Fura-2AM (2,5 mM):** 1 mg liofilizado, se disuelve en 400 µl de DMSO, teniendo así una disolución de 2,5 mM de fura-2AM por mL. Protegida de la luz con papel aluminio. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Molecular Probes.
- 1.21 Ionomicina (500 µM):** 1 mg diluido en 1338 µl DMSO. Guardado a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.22 Manganeso (1 M):** se diluye 99 mg de $\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 500 µl de agua ultra-pura, se agita bien hasta que quede disuelto. Debe prepararse en el momento en que se realice el experimento. Mantener a 4 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.23 ProstaglandinaE1 (PGE₁):** diluida en DMSO para tener una concentración de trabajo de (5 mM). Protegida de la luz con papel aluminio. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.24 Paraformaldehido (PA) (16 %):** 16 g de PA diluido en 100mL de agua ultra-pura y calentado a 65 °C, se le añade 1-3 pastillas de NaOH (0,1 N) para ayudar a disolver, hasta que la solución este transparente. Se guarda a -20 °C. Marca comercial Sigma.
- 1.25 Tampón Madre HEPES (10X):** la solución está compuesta por:
- Na Cl (136 mM)
 - K Cl (2,7 mM)
 - Cl_2 Mg (2 mM)
 - NaH_2PO_4 (0,42 mM)
 - HEPES (5 mM)
- Diluido en agua ultra pura y guardado a 4 °C.
- 1.26 Tampón-1:** Medio Hepes Ácido pH=6,6 sin calcio.
- 22 mL de agua ultra pura
 - 2,5 mL de solución HEPES Madre (10 X)
 - 250 µl Glucosa (0,5 M)
 - pH a 6,6

-
- 100 μ l de EGTA (125 mM), para eliminar el calcio presente en el medio.
 - 25 mg de Albúmina.

1.27 Tampón-2: Medio Hepes pH=7,4 bajo en calcio.

- 44 mL de agua ultra pura
- 5 mL de solución HEPES Madre (10 X)
- 500 μ l Glucosa (0,5 M)
- pH a 7,4
- 50 mg de Albúmina.

2. *MATERIAL*

- Material de disección
- Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)
- Micropipetas

3. *EQUIPOS*

- Microscopio Óptico
- Baño termostático Tectron Bio. P. Selecta
- Balanza de precisión (KERN-EW)
- Balanza de precisión
- Centrifuga Labofuge 300 Heraeus
- Lámpara de luz fría
- Fluorímetro Spectronic Unicam. AMINCO BOWMAN. Serie 2
- Agregómetro: Aggreco PA 3210
- Cámara de video Sony 151 AP
- FACSsort Cell Sorter Flow Cytometer. Becton-Dickinson
- Equipo de análisis de imagen Q-550 MC Leica.

4. TABLAS

4.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Tabla A: Valores de % de Agregación Máxima, tras el tratamiento agudo con Homocisteína (Hcy), en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 15, 21 días y con ascitis. (*): $p < 0,05$ vs Cys.

	Ctrl. Sin/Tto (n=6)	LCB(15d) Sin/Tto (n=6)	LCB(21d) Sin/Tto (n=7)	LCB(Asc) Sin/Tto (n=6)
Cys	57,2±2	73,9±2,6	72,2±1,5	49,3±3,6
Hcy (10 µM)	66,5±6,4	75,3±2,8	78±2,7	48,5±4,3
Hcy (25 µM)	69,9±4,1 *	75,5±2,8	74,8±1,8	50,3±3,5
Hcy (100 µM)	68,2±2,8 *	78,9±3,2	75,2±1,6	49±2,8

Tabla B: Valores de % de Agregación Máxima, tras el tratamiento agudo con Homocisteína (Hcy). En ratas control y con ligadura del conducto biliar de 15, 21 días y con ascitis, tratadas crónicamente con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Cys.

	Ctrl Con/tto (n=7)	LCB(15d) Con /tto (n=6)	LCB(21d) Con /tto (n=6)	LCB(Asc) Con /tto (n=6)
Cys	49,7±3,5	58,7±2,8	65,3±8	29,1±6,2
Hcy (10 µM)	56,6±3,1	66,7±2,3	69,8±9,6	23,8±5,4
Hcy (25 µM)	57,8±2,7	67,2±2,1	73,9±9,6	24,2±6,4
Hcy (100 µM)	60,5±2,4 *	64,3±3,4	74,6±9,3	28,5±6,1

4.2 CONCENTRACIONES DE Ca²⁺ INTRACELULAR

A. TRATAMIENTO CRÓNICO CON L-NAME

Tabla C: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la entrada de Ca²⁺ intracelular en respuesta a la trombina (30 s de registro), en plaquetas de animales control y LCB 21 días, tratadas crónicamente con L-NAME.

	Ctrl (n=5)	LCB(21d) (n=5)
Tr (0,1 U/mL)	57294,3±1607,8 (n=5)	60470,8±1593,7 (n=5)
Tr (0,3 U/mL)	77595,2±3838,6 (n=5)	83730,5±4644,9 (n=5)

B. VACIAMIENTO DE LOS ALMACENES DE NO CON BSO

Tabla D: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada de Ca²⁺ intracelular en respuesta a la Trombina (0,3 U/mL) (30 s de registro), en plaquetas de animales control y LCB 21 días y con Ascitis, tratadas agudamente con BSO.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin BSO	30957,3±2616,8 (n=5)	32751,1±2307,9 (n=8)	34150,4±3286,2 (n=5)
Con BSO	29650,3±1916,7 (n=5)	29860,6±1430,1 (n=7)	31977,3±2230,6 (n=6)



C. TRATAMIENTO AGUDO CON ÁCIDOS BILIARES

Tabla E: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los Niveles totales de Ca²⁺ intracelular en respuesta a TG + Iono (30 s de registro), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con ácidos biliares.

	Ctrl (n=6)	LCB (21d) (n=5)	LCB (Asc) (n=6)
Salino	7870,5±837,5	11098,7±1626,7	8396±1471,1
DC (100 µM)	6686,2±871,7	10343,5±10343,5	7810,3±7810,3
CDC (100 µM)	6583,8±870,8	8096,3±936,3	7272,6±1106,8

D. TRATAMIENTO AGUDO CON HOMOCISTEÍNA

Tabla F: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Liberación de Ca²⁺ intracelular en respuesta a trombina (0,1 y 0,3 U/mL) y ADP (5 µM) (30 s de registro) en controles, LCB 21 días y con ascitis.

		Ctrl Sin/tto	LCB (21d) Sin/tto	LCB (Asc) Sin/tto
Tr (0,1 U/mL)		2366,1±229,1 (n=10)	3710,4±310,2 (n=18)	3035,3±813,6 (n=18)
Tr (0,3 U/mL)	Cys	3988,3±309,1 (n=8)	5755,1±289,4 (n=9)	4542,52±655,6 (n=6)
	Hcy 10	3919±265,9 (n=8)	5472,8± 377,8 (n=6)	5279,6±336,6 (n=5)
	Hcy 25	4169,8± 349,1 (n=8)	5215,2± 320,59 (n=8)	5140,98±310,6 (n=6)
ADP (5 µM)	Cys	6347,7±276,4 (n=14)	7305,8±253,2 (n=22)	7661,1±1209,9 (n=6)
	Hcy 10	6166,5±22,4 (n=8)	7083,6±299,9 (n=11)	7661,1±1209,9 (n=6)
	Hcy 25	5926,6±30,8 (n=9)	7167,9±314,8 (n=11)	8292±1019,4 (n=6)

Tabla G: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca²⁺ extracelular (180 s de registro) en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento agudo con homocisteína (Hcy).

A				B			
Respuesta a TG	Ctrl (n=9)	LCB(21d) (n=13)	LCB(Asc) (n=8)	Respuesta a Ca ⁺⁺	Ctrl (n=9)	LCB(21d) (n=13)	LCB(Asc) (n=5)
Cys	2533,3	3222,1	2928,1	Cys	218794,2	183770,1	146814,5
	± 507,3	± 317	± 568,4		± 22056,8	± 8614,5	± 24604
Hcy (10µM)	2433,1	3014,6	3033,3	Hcy (10µM)	207622,5	188643,6	183151,1
	± 187,8	± 274,02	± 334,9		± 9685,5	± 6446,3	± 10073,7
Hcy (25µM)	2146,6	3030,9	3123,2	Hcy (25µM)	231041,5	186410,8	181356,6
	± 247,9	± 211,1	± 312,1		± 22012,3	± 9800,2	± 20725,8

Tabla H: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los niveles totales de Ca²⁺ plaquetario, en respuesta a TG + Ionocina (30 s de registro) en controles, LCB 21 días y con ascitis.

	Ctrl (n=11)	LCB(21d) (n=6)	LCB(Asc) (n=5)
TG+Iono	6752,8	9336,2	6860,4
	± 359,4	± 779,4	± 370,9



E. TRATAMIENTO CRÓNICO CON ACIDO FÓLICO

Tabla I: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los Niveles Basales de Ca^{2+} intracelular en respuesta a Trombina (0,3 U/mL), (30 s de registro) en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin/tto Ac. Fólico	17,5±2,9 (n=10)	36,4±3,1 (n=12)	39,9±7 (n=6)
Con/tto Ac. Fólico	24,9±2,2 (n=6)	31,6±2,1 (n=14)	29,4±1,6 (n=4)

Tabla J: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de los Niveles totales de Ca^{2+} intracelular en respuesta a TG+Ionomicina, (30 s de registro) en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico.

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin/tto Ac. Fólico	6752,8±359,4 (n=5)	9336,2±779,4 (n=11)	6860,4±370,9 (n=5)
Con/tto Ac. Fólico	5896,3±400,5 (n=7)	8926,1±901,9 (n=12)	7498,8±1036,7 (n=5)

Tabla K: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la Entrada Capacitativa de Ca²⁺ extracelular (180 s de registro), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido Fólico.

A				B			
Respuesta a TG	Ctrl	LCB(21d)	LCB(Asc)	Respuesta a Ca ⁺⁺	Ctrl	LCB(21d)	LCB(Asc)
Sin/tto	2533,3	3222,1	2928,1	Sin/tto	218794,2	183770,1	146814,5
Ac.Fólico	±	±	±	c.Fólico	±	±	±
	507,3	317	568,4		22056,8	8614,5	24604
	(n=9)	(n=13)	(n=8)		(n=9)	(n=13)	(n=5)
Con/tto	1672,1	3040,7	4082,1	Con/tto	197297,4	160240,2	241445,5
Ac.Fólico	±	±	±	Ac.Fólico	±	±	±
	168,5	225,2	585,9		20262	10654,5	14252,2
	(n=7)	(n=11)	(n=6)		(n=7)	(n=11)	(n=6)

Tabla L: Efecto del tratamiento del ácido Fólico, expresado en % de descenso en la Agregación Máxima. En controles y con ligadura del conducto biliar de 15, 21 días y con ascitis. (*): p<0,05 vs LCB (15 d) sin/tto; (◆): p<0,05 vs LCB (Asc) sin/tto.

Agregación Máxima		Agregación Máxima		% Descenso
Control	100±3,5	Control	87±6,1	12,9
Sin/tto	(n=6)	Con/tto	(n=7)	
LCB(15d)	100±3,5	LCB(15d)	79,5±3,9 *	20,5
Sin/tto	(n=6)	Con/tto	(n=6)	
LCB(21d)	100±2,5	LCB(21d)	90,5±11,1	9,5
Sin/tto	(n=7)	Con/tto		
LCB(Asc)	100±7,3	LCB(Asc)	59,1±12,5 ◆	40,9
Sin/tto	(n=6)	Con/tto	(n=6)	



Tabla M: Valores del área bajo la curva (expresado en nM) de la liberación de Ca^{2+} intracelular en respuesta a Trombina (0,3 U/mL), en controles, LCB 21 días y con ascitis, tras el tratamiento crónico con ácido fólico. (*): $p < 0,05$ vs Ctrl sin/tto

	Ctrl	LCB (21d)	LCB (Asc)
Sin/tto Ac. Fólico	3988,3± 309,1 (n=8)	12336,7± 748,6 (n=6)	9534,6± 1334,1 (n=6)
Con/tto Ac. Fólico	3037,9±288,9 * (n=7)	9998,4± 1665,9 (n=7)	9782,9±1205,5 (n=5)

4.3 TABLA DE NIVELES PLASMÁTICOS HOMOCISTEINA

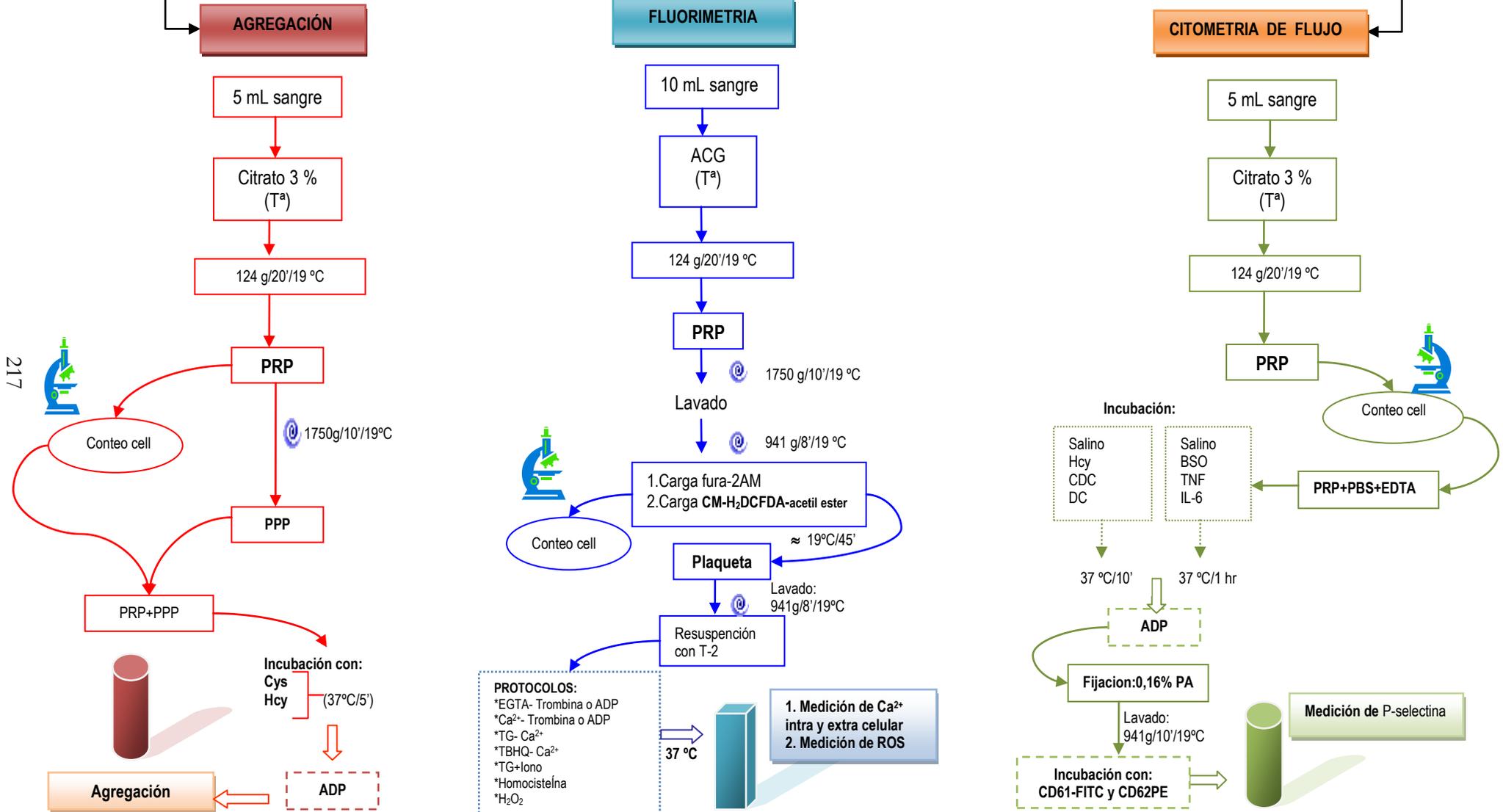
Tabla N: Niveles plasmáticos de homocisteína (Hcy) en ratas control y con ligadura del conducto biliar de 21 días, tras la sobrecarga con L-metionina. (*): $p < 0,05$ vs mismo grupo basal, (●): $p < 0,05$ vs Ctrl con sobrecarga L-metionina

	Ctrl (n=7)	LCB (21d) (n=8)
Hcy Basal (μM)	2,9±0,2	3,1±0,5
Hcy tras sobrecarga L-metionina (μM)	6,6±0,6 *	10,6±1,6 *,●



ESQUEMA DE TRABAJO

Animal de estudio



217