



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN TERRITORIO
ARTERIAL EN PACIENTES JÓVENES CON
ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA**

TESIS DOCTORAL

Autora: Elena Furió Rodríguez

Directores: Dra. M^a José García-Fuster González-Alegre

Dra. Laura Piqueras Ruíz

Dr. Fernando Martínez García

Tutor: Prof. Josep Redón i Más.

Valencia, Octubre 2015

TÍTULO:

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN TERRITORIO ARTERIAL EN
PACIENTES JÓVENES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA
VENOSA

TESIS DOCTORAL

Autora:

Elena Furió Rodríguez

Directores:

Dra. M^a José García-Fuster González-Alegre

Dra. Laura Piqueras Ruíz

Dr. Fernando Martínez García

Tutor:

Prof. Josep Redón i Más

Octubre, 2015

D. Josep Redón i Más, jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico, **Dña. M^a José García-Fuster González-Alegre**, jefe clínico Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico, **Dña. Laura Piqueras Ruíz**, Investigadora adscrita a la Fundación del Hospital Clínico, INCLIVA y **D. Fernando Martínez García**, médico especialista en Medicina Interna del Hospital Clínico

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN TERRITORIO ARTERIAL EN PACIENTES JÓVENES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA” presentado por la **Lda. Elena Furió Rodríguez** para obtener el grado de doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología, bajo nuestra dirección.

Valencia, 27 de Octubre de 2015

Fdo. Dr. Josep Redón i Más

Fdo. Dra. María José García-Fuster

Fdo. Dra. Laura Piqueras Ruíz

Fdo. Dr. Fernando Martínez García

A mi madre

Agradecimientos

En primer lugar quiero mostrar mi mayor agradecimiento a mis directores de Tesis. A la Dra. M^a José García-Fuster, por su motivación para la realización de este proyecto, por su incansable ayuda, y por ser para mí todo un ejemplo de profesionalidad. A la Dra. Laura Piqueras, por enseñarme tanto acerca de la investigación, por sus sabios consejos, paciencia y dedicación en todo momento; gracias por hacerlo posible. Y al Dr. Fernando Martínez, por su aportación en el desarrollo de esta Tesis.

Al Prof. Josep Redón, por su gran ayuda y confianza depositada en mí. Habéis sido unos grandes maestros y un gran apoyo a todos los niveles.

A la Dra. M^a Jesús Sanz, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A mis compañeros y enfermeras de la sala de Medicina Interna por su disposición, ayuda y cariño durante estos años.

A Cristina, por los comienzos, y a Virginia y Paula, por ser mis compañeras de laboratorio y por ayudarme tanto.

Y como no, a los pacientes y voluntarios, por su paciencia y colaboración

Quiero también agradecerse a mi familia,

A mi padre, por la fuerza que me ha dado y porque espero se sienta orgulloso de mí. A mi madre, porque a ella le debo todo, gracias por permanecer a mi lado. A Manolo, Santiago, María y Pablo, mis hermanos, por estar siempre ahí.

Y especialmente a Javi, mi apoyo en todo momento desde el principio y hasta el fin. Sin ti, créeme, no lo hubiera conseguido. Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Trombosis vasculares	23
1.1.1. La enfermedad tromboembólica venosa. Factores de riesgo	24
1.1.2. La aterosclerosis y trombosis arterial. Factores de riesgo.....	28
1.1.3. Trombosis arterial y venosa. Evidencia clínica y mecanismos comunes	29
1.2. La inflamación como nexo entre la patología arterial y venosa.....	32
1.2.1. El proceso inflamatorio	32
1.2.1.1. Mediadores de la respuesta inflamatoria.....	32
1.2.1.2. Etapas de la infiltración leucocitaria.....	36
1.2.1.2.1. Adhesión primaria y rodamiento	37
1.2.1.2.2. Activación y adhesión firme.....	38
1.2.1.2.3. Migración y quimiotaxis	38
1.2.1.3. La disfunción Endotelial	39
1.2.2. Las Plaquetas	41
1.2.2.1. Características generales	41
1.2.2.2. Las plaquetas en la hemostasia primaria.....	44
1.2.2.3. Las plaquetas en la inflamación	46
1.2.3. Quimiocinas	51
1.2.3.1. Consideraciones generales.....	51
1.2.3.2. Características estructurales	51
1.2.4. Fractalquina	53
1.2.4.1. Consideraciones generales.....	53
1.2.4.2. Fractalquina como agente quimiotáctico	56
1.2.4.3. Fractalquina y plaquetas	57
1.2.5. CXCL16.....	58
1.2.5.1. Consideraciones generales.....	58
1.2.5.2. CXCL16 como agente quimiotáctico.....	59
1.2.5.3. CXCL16 y plaquetas	60

4.2.Determinación de las quimiocinas circulantes fractalquina (CX ₃ CL1), CXCL16 y PF-4/CXCL4, P- SELECTINA y ENDOGLINA/CD105.....	91
4.3.Estudio de la adhesividad leucocitaria al endotelio vascular	95
4.4.Estudio del papel de la fractalquina en la inflamación vascular	96
4.5.Estudio del papel de las plaquetas en la inflamación vascular.....	100
4.6.Estudio del papel de CXCL16 en la inflamación vascular	102
5. DISCUSIÓN	109
6. CONCLUSIONES	125
7. BIBLIOGRAFIA	129

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADP: difosfato de adenosina

AMPc: adenosin monofosfato cíclico

ANA: anticuerpos antinucleares

AE: aterosclerosis

CX₃CL1: quimiocina fractalquina

CX₃CR1: receptor de fractalquina

CXCL16: quimiocina CXCL16

CXCR6: receptor de CXCL16

DM: diabetes mellitus

ECV: enfermedad cardiovascular

ESM: error estándar de la media

ETV: enfermedad tromboembólica venosa

EP: embolia pulmonar

FT: factor tisular

FvW: factor de von Willebrand

GP: glicoproteína

HDL: lipoproteína de alta densidad

HUAEC: células endoteliales de arteria de cordón umbilical humano

HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

HTA: hipertensión arterial

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

IMC: índice de masa muscular

INF-8: interferón-8

IL-8: interleukina-8

IQ: índice de Quick

LDL: lipoproteína de baja densidad

LTs: leucotrienos

MAC: molécula de adhesión celular

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1

NO: óxido nítrico

PA: presión arterial

PAF: factor activador de plaquetas

PAI: inhibidor del activador del plasminógeno

PDGF: *platelet derived growth factor*

PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PF-4: factor plaquetario-4

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

RANTES: *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*

SCA: síndrome coronario agudo

TGF-β: factor de crecimiento transformante-β

TNFα: factor de necrosis tumoral α

TP: tiempo de protrombina

TSH: hormona estimuladora del tiroides

TTPA: tromboplastina parcial activada

TVP: trombosis venosa profunda

VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VSG: velocidad de sedimentación globular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de la coagulación.

Figura 2. Unión de las plaquetas activadas a los leucocitos.

Figura 3. Estructura de la fractalquina.

Figura 4. La formación de la fracción soluble de la fractalquina.

Figura 5. Modelo clásico y vías de la fractalquina en la cascada de adhesión.

Figura 6. Sistema de la cámara de flujo paralelo.

Figura 7. Esquema citómetro de flujo.

Figura 8. Estrategia de “gating” para las plaquetas.

Figura 9. Estrategia de “gating” para los monocitos.

Figura 10. Estrategia de “gating” para los linfocitos.

Figura 11. Niveles de la quimiocina fractalquina en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 12. Niveles de la quimiocina CXCL16 en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 13. Niveles de P-selectina en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 14. Niveles de PF-4/CXCL4 en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 15. Niveles de Endogлина/CD105 en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 16. Acumulación leucocitaria en HUAEC y HUVEC estimuladas con TNF α mediante el empleo de sangre entera de pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 17. Efecto de un anticuerpo neutralizante de fractalquina sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC inducida por TNF α .

Figura 18. Expresión de CX₃CR1 en monocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

Figura 19. Expresión de CX₃CR1 en linfocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

Figura 20. Expresión de CX₃CR1 en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

Figura 21. Efecto de la disociación de la unión de plaquetas a leucocitos sobre la adhesión de leucocitaria en HUAEC y HUVEC inducida por TNF α en pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Figura 22. Incremento de la expresión de PAC-1 y de P-selectina en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

Figura 23. Efecto de un anticuerpo neutralizante de CXCL16 sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC inducida por TNF α .

Figura 24. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles por citometría de flujo

Figura 25. Efecto de la disociación de la unión de plaquetas a leucocitos sobre la adhesión de leucocitaria en HUAEC y HUVEC inducida por TNF α , y tras la neutralización de CXCL16.

Figura 26. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en monocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

Figura 27. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en linfocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Moléculas liberadas por las células endoteliales y su función.

Tabla 2. Anticuerpos para la detección de células polimorfonucleares.

Tabla 3. Características generales de los pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Tabla 4. Valores de los parámetros bioquímicos de los pacientes con antecedentes de TVP y controles.

Tabla 5. Valores del grosor de la íntima media carotídea derecha e izquierda por ecografía, a nivel antero-lateral, medio-lateral y postero-lateral, en pacientes con antecedentes de TVP y controles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TROMBOSIS VASCULARES

Durante muchos años la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y la enfermedad vascular arterial se han considerado enfermedades diferentes. Las diferencias se justificaban en cuanto a la interpretación de su fisiopatología, de los factores epidemiológicos que intervienen en su aparición, y del planteamiento terapéutico.

La trombosis venosa se ha considerado una patología donde el protagonismo lo ejercía casi en exclusiva la coagulación sanguínea, con muy poca participación del elemento celular del sistema hemostático, endotelio y plaquetas. Por el contrario, en la patología arterial se ha considerado que el sistema de la coagulación sanguínea jugaba un papel menor y participaba de forma casi exclusiva la pared del vaso y plaquetas junto a la respuesta inflamatoria.

El sistema hemostático es hoy en día concebido como la expresión de una intensa interacción dinámica de los compartimentos celulares, plasmáticos, factores reológicos, etc. El conocimiento de aspectos más básicos del sistema hemostático ha demostrado que las supuestas “diferencias” entre hemostasia primaria y coagulación sanguínea, o vías de activación “extrínseca” o “intrínseca”, han tenido un indudable valor académico para poder entender de forma más sencilla este sistema, pero están lejanas de lo que acontece in vivo, donde no existen compartimentos estancos. Desde hace tiempo ha quedado de manifiesto la importante interacción bidireccional del sistema hemostático con otros mecanismos de defensa del organismo, como son el de la respuesta inflamatoria o el de la inmunidad innata, asociándose a la trombosis venosa, al igual que a la aterosclerosis, un importante componente inflamatorio. En este sentido, numerosos estudios realizados en la última década evidencian una interrelación entre arteriosclerosis (AE) y/o

enfermedad arterial y trombosis venosa, siendo posible una etiopatogenia común entre ambas patologías.

1.1.1 La enfermedad tromboembólica venosa. Factores de riesgo

La enfermedad tromboembólica venosa se define como a la formación de un trombo en el sistema venoso profundo (TVP) y su posible desplazamiento al pulmón, dando lugar a una embolia pulmonar (EP). Ambas entidades podemos encontrarlas en la práctica médica tanto aislada como conjuntamente (1). La mortalidad es elevada en los primeros momentos de la EP y las secuelas de ambas manifestaciones, la hipertensión pulmonar y el síndrome postrombótico, generan una morbilidad elevada con amplia repercusión socioeconómica (2).

A nivel de la población general de los países occidentales, se estima que se producen al año entre 70 y 180 nuevos casos de ETV sintomática por cada 100.000 habitantes. Esta variabilidad en la incidencia se debe a los diferentes métodos diagnósticos utilizados, así como al diferente grado de sospecha diagnóstica en las poblaciones estudiadas (2, 3). El estudio VITAE estima para la Unión Europea una incidencia anual para la TVP y EP de 148/100.000 y 95/100.000 habitantes, respectivamente. De acuerdo con este estudio, en el año 2004 se produjeron en los seis países participantes (300 millones de habitantes), entre los que figuraba España, más de 460.000 nuevos casos de TVP y 290.000 de EP, de los que fallecieron 26.000 a pesar de recibir tratamiento (4).

En 1884 Rudolph Virchow enunció como etiopatogenia de la ETV la siguiente triada fisiopatológica: lesión de la pared vascular, estasis sanguíneo y estado de hipercoagulabilidad. Esta triada está vigente en la actualidad, ampliada y perfeccionada con los avances científicos y técnicos que continuamente dan a conocer nuevos perfiles de la misma. Dentro de estos tres factores, el estasis sanguíneo y el estado de

hipercoagulabilidad, han tenido especial protagonismo como desencadenantes de una alteración de la hemostasia y formación de un trombo venoso. La hemostasia sanguínea depende de un equilibrio dinámico derivado de la existencia de factores procoagulantes, inhibidores de la coagulación y fibrinolíticos. Cuando existe predominio de los primeros o disminución de los segundos, surge el estado de hipercoagulabilidad o trombofilia que conlleva el desarrollo de un trombo en el sistema venoso.

En los últimos años se han identificado polimorfismos genéticos de algunos factores de la coagulación, así como distintos elementos orgánicos que pueden favorecer el desencadenamiento de fenómenos trombóticos. Esto ha llevado a clasificar los factores de riesgo venosos en congénitos, adquiridos y mixtos. La denominación de trombosis idiopática se atribuye a aquellos pacientes en los que no se encuentra ninguno de éstos factores, siendo un 30% del total de los casos (5).

Entre los *factores de riesgo congénitos* que predisponen al desarrollo de un evento tromboembólico se conocen clásicamente el déficit de antitrombina III (6), el déficit de proteína S y C (7, 8), la presencia del factor V de Leiden (9) y la mutación de la protrombina G20210A (10). Continuos trabajos de investigación tratan de encontrar nuevas mutaciones que favorezcan una hipercoagulabilidad. Se consideran *factores mixtos* los anticuerpos antifosfolipídicos y la hiperhomocisteinemia, dado que su origen puede ser tanto congénito como adquirido (11, 12).

De forma similar a las enfermedades cardiovasculares la incidencia anual de ETV aumenta con la edad (13), pero independientemente diferentes situaciones representan un *factor de riesgo adquirido* para el desarrollo de trombosis. La inmovilización o el sedentarismo, situaciones

en las que la musculatura de los miembros inferiores pierde la capacidad de bombeo, pueden aumentar su riesgo de aparición hasta cinco veces (14), habiéndose descrito incluso el “síndrome de la clase turista” o lo que es lo mismo, la aparición de TVP o EP en los pacientes que realizan vuelos de larga duración con poca movilidad en los miembros inferiores (15). La obesidad también es considerada un factor de riesgo ya que supone una dificultad para el retorno venoso y se asocia a un aumento en la formación de trombina y disminución de la fibrinólisis (16-19). Otros autores consideran que el paciente obeso se encuentra en un estado de inflamación crónica que puede aumentar los factores de coagulación, así han descrito la relación entre el índice de masa corporal y el aumento del factor VIII (20). Son factores de riesgo también la cirugía o el traumatismo mayor (21), el embarazo (22) y la terapia estrogénica (23), donde diferentes estudios le atribuyen el riesgo a una disminución de la proteína C activa circulante. Finalmente, es bien conocida la asociación entre el cáncer y la presencia de ETV, principalmente debido a la producción de factores procoagulantes por el propio tumor, presentándose hasta en un 4-10% de los casos de ETV una neoplasia oculta en el momento del diagnóstico (24, 25).

Recientemente la inflamación ha sido considerada de gran interés en el desencadenamiento de las trombosis venosas. Durante el proceso inflamatorio se produce una alteración en el equilibrio hemostático que puede condicionar la formación del trombo. Por un lado, las diferentes citoquinas inflamatorias son capaces de activar la coagulación. Así, se ha visto que el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y otros mediadores de la inflamación pueden disminuir la regulación del receptor de la proteína C, y en modelos animales se ha visto también como la Interleukina-6 (IL-6) disminuye los niveles de proteína S, cofactor de la proteína C en la

inactivación de los factores Va y VIIIa, incluso puede aumentar la capacidad de respuesta de las plaquetas y por tanto, el potencial trombogénico (26). Diversos estudios hasta el momento han medido algunos de estos marcadores, como la proteína C reactiva, TNF α , IL-6, IL-8, *monocyte chemoattractant/chemotactic protein-1* (MCP-1), P-selectina o el Factor von Willebrand (FvW), y han observado un incremento de los mismos en aquellos pacientes con trombosis venosa respecto a los que no la presentan (27-29). Algunos de estos marcadores además, como el TNF α , IL-6 e IL-8, han sido estudiados tanto en el episodio agudo trombótico como posteriormente, observándose un descenso posterior al episodio, lo que para algunos autores podría ser debido a las propiedades antiinflamatorias del tratamiento anticoagulante iniciado. En el caso de la IL-8, se ha observado que sus niveles plasmáticos se mantienen elevados (30), lo que ha llevado a plantear el valor tanto pronóstico como diagnóstico de algunos de estos marcadores (28). Se han medido también citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10, IL-13, o el factor de crecimiento transformante β (TGF β), observándose un descenso de las mismas en pacientes con trombosis venosa, principalmente de la IL-10 (31).

Por otro lado, en el proceso inflamatorio hay una disminución del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (32) y disminuye la actividad de las vías que inhiben la coagulación. Estas vías son tres fundamentalmente (33-35):

-El sistema trombina-trombomodulina. La trombomodulina es una glicoproteína que se encuentra en el endotelio vascular, actúa como un anticoagulante al unirse a la trombina, impidiendo que convierta el fibrinógeno en fibrina, y por tanto, la formación del coágulo, activación de las plaquetas y de factores de coagulación Va y VIIIa.

-El sistema de inhibición del factor tisular o tromboplastina. Evita la formación de trombina y por tanto la cascada de coagulación.

-El sistema de la proteína C. Esta vía juega un papel principal en la prevención de las trombosis en la microvascularización y proporciona un modelo del impacto de la inflamación en la coagulación y en la regulación de la misma. La proteína C activada inactiva los cofactores Va y VIIIa con lo cual inhibe el proceso de coagulación y reduce también la expresión de factor tisular. La vía se inicia cuando la trombina se une a la tromboomodulina en la superficie endotelial, complejo que activa el receptor de la proteína C, que se encuentra también en la superficie del endotelio, activando a la proteína C. Posteriormente es desprendida del endotelio por los mediadores de la inflamación uniéndose a los neutrófilos activados e inhibiendo la extravasación leucocitaria. Puede incluso regular su expresión y de la proteína C activada, mediando, por tanto, en la respuesta inflamatoria en el endotelio vascular.

1.1.2 La aterosclerosis y trombosis arterial. Factores de riesgo

La aterosclerosis es un proceso complejo que se caracteriza histológicamente por una lesión focal, placa aterosclerótica, en arterias de mediano y gran calibre. Dicha placa esta constituida por un cúmulo de células, material extracelular y lípidos en el espacio comprendido entre el endotelio (íntima) y las células de la musculatura lisa (media). La trombosis arterial o aterotrombosis se produce por la rotura de la placa de ateroma y acumulo de plaquetas y leucocitos hasta ocluir el flujo arterial. Cuando parte de esta placa es desprendida a distancia se produce la embolia arterial periférica. Estos eventos se traducen clínicamente en infartos de miocardio, ictus y enfermedad vascular arterial periférica, y pueden a su vez aumentar la morbimortalidad de maniobras diagnóstico terapéutica como angioplastias coronarias o arteriografías (36).

Se estima que la enfermedad cardiovascular (ECV) causa 4 millones de fallecimientos en Europa, lo que supone un 47% de todas las muertes. En España, también las ECV son la primera causa de muerte para el conjunto de la población, siendo la enfermedad arterial coronaria y el ictus los principales responsables de las defunciones, predominando la primera en hombres y la segunda en mujeres (37). La tasa bruta de mortalidad por ECV actual es de 285/100.000 habitantes, 239 en varones y 282 en mujeres (*Instituto Nacional de Estadística*).

Anteriormente se consideraba que el proceso de aterogénesis consistía básicamente en la acumulación pasiva de lípidos en el interior de las paredes arteriales, sin embargo los avances científicos atribuyen un papel central a la inflamación, la cual participa en todas las fases de la aterosclerosis hasta su progresión hacía las complicaciones de la trombosis aguda (38).

Los factores de riesgo arteriales clásicos son la hipertensión arterial, la dislipemia y la diabetes mellitus, así como la obesidad, lo que constituye el llamado síndrome metabólico que se asocia a un alto riesgo cardiovascular (39-43). También el tabaquismo está identificado como un claro factor de riesgo que favorece la presencia de arterioesclerosis (44), así como la propia edad, asociada al aumento de rigidez y pérdida de elasticidad en la pared arterial (45).

1.1.3 Trombosis arterial y venosa. Evidencia clínica y mecanismos comunes

En los últimos años, en diferentes estudios, se ha observado que los factores de riesgo que parecen exclusivos para el desarrollo de aterosclerosis están asociados también al desarrollo de trombosis venosa (14, 46-50). En el metanálisis llevado a cabo por Ageno y col., y que recoge la literatura publicada hasta el año 2007, se pone de manifiesto

dicha asociación (46). La *edad* es reconocida como un factor de riesgo independiente para el desarrollo tanto de trombosis y aterosclerosis (51, 52), observándose un incremento de ambas patologías conforme el paciente es más anciano. El *síndrome metabólico*, claramente inductor de arterioesclerosis, se ha relacionado con una mayor incidencia de trombosis venosa sobre todo idiopática (53-55). La *diabetes mellitus* se asocia a niveles elevados de factores procoagulantes y a la inhibición de la fibrinólisis endógena (56-61), habiéndose demostrado mayor riesgo de trombosis venosa en pacientes diabéticos (62-64). Del mismo modo, se ha observado que presentan trombosis venosas con más frecuencia los pacientes *hipertensos* que los que no lo son, aunque para algunos autores el factor edad juega un importante papel en esta asociación (46, 64). También *la dislipemia* se asocia con estados de hipercoagulabilidad, disfunción endotelial y agregación plaquetaria. El aumento de LDLc y de lipoproteína a, se ha visto relacionado recientemente con la presencia de trombosis idiopática (65, 66), de igual modo que los niveles bajos de HDLc y la hipertrigliceridemia (67-69). En el estudio MEGA (Multiple Environmental and Genetic Assessment) de los factores de riesgo de trombosis venosa, se observó un riesgo mayor de trombosis también en fumadores respecto a los no fumadores. Esta relación era mayor cuanto más cantidad y más tiempo se fumaba, lo que supone un relación dosis dependiente, relación que ha sido corroborada posteriormente por otros autores (70-73).

De forma similar, estudios epidemiológicos han identificado gran número de factores considerados clásicamente propios de la ETV que pueden originar daño endotelial o desequilibrio hemostático predisponiendo a la trombosis arterial como son la *hiperhomocisteinemia*, el aumento de la *proteína C reactiva*, la presencia

de anticuerpos antifosfolípidos, la hiperfibrinogenemia, el aumento del factor VIII de la coagulación o del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y trombofilias congénitas.

Prandoni y col. en 1996, fueron los primeros en observar una alta prevalencia de eventos cardiovasculares en una cohorte de pacientes con trombosis venosa profunda (74). Posteriormente, en el año 2003 (75), estos mismo autores valoraron la presencia de aterosclerosis carotídea en pacientes con trombosis venosa y sin ella, observando una prevalencia significativamente superior en los pacientes, sobre todo si ésta había sido idiopática. Becattini y col. en el año 2005 (76), también observaron una mayor incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con trombosis venosa idiopática, corroborando posteriores estudios la mayor prevalencia de arterioesclerosis subclínica cuando las trombosis son de origen idiopático, con una incidencia superior a la de la población general (75-78).

Posteriormente, se han publicado diversos estudios en los que se muestra una afectación arterial en presencia de estados trombóticos venosos. Así, se ha demostrado la presencia de un mayor grosor de la íntima media carotídea y de la arteria femoral en pacientes con trombosis venosa, observando placas de ateroma en un 70% de los pacientes frente al 30% en los sujetos sin trombosis (79), así como calcificaciones en las arterias coronarias (51) y afectación arterial periférica (80), hechos que aumentan la evidencia de una asociación entre ambas patologías.

Todas estas experiencias han desencadenado gran interés en el estudio de una posible etiopatogenia común entre la patología venosa y arterial, cuya base estaría en la inflamación y disfunción del endotelio vascular.

1.2. LA INFLAMACIÓN COMO NEXO ENTRE LA PATOLOGÍA ARTERIAL Y VENOSA

1.2.1 EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es una reacción que se caracteriza por el movimiento de fluido y leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia el tejido extravascular. Se inicia, normalmente, con un daño tisular causado por un agente agresor donde el organismo reconoce el daño y pone en marcha los mecanismos responsables de la localización y eliminación del agente extraño. Después se activan tanto mediadores solubles como componentes celulares de la inflamación que producen la amplificación de la respuesta inflamatoria. En condiciones normales, el agente agresor es destruido, se inhiben los mediadores inflamatorios, y se regenera el tejido dañado recuperando sus funciones fisiológicas. En algunas circunstancias, la inflamación puede no cumplir adecuadamente su función de defensa o los mecanismos reguladores se alteran, dando lugar a una respuesta inflamatoria exagerada que agrava el daño tisular (81, 82).

1.2.1.1 Mediadores de la respuesta inflamatoria

Los fenómenos básicos de la inflamación son regulados por los sustratos conocidos como mediadores de la inflamación. Estos mediadores, son de naturaleza diversa y se clasifican:

a) Según su origen:

- De origen plasmático: sistema del complemento, cininas, sistema de la coagulación y fibrinolítico. Son los que desencadenan la reacción inflamatoria al reconocer toxinas y células dañadas y también contribuyen a amplificar la respuesta inflamatoria.

- De origen celular (mediadores preformados y almacenados en gránulos citoplásmicos o rápidamente sintetizados ante un estímulo inflamatorio): péptidos y aminas, el óxido nítrico (NO), citocinas proinflamatorias como el TNF α , mediadores lipídicos como las prostaglandinas, leucotrienos (LTs), factor activador de plaquetas (PAF) y quimiocinas, entre otros. Son, en parte, responsables de la amplificación de la respuesta inflamatoria.
- Derivados de los microorganismos invasores: péptidos formilados quimiotácticos y endotoxinas. Entre ellos encontramos a las moléculas vasoactivas, que actúan directamente sobre la vasculatura para aumentar la permeabilidad vascular, y los factores quimiotácticos, que promueven la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio.

b) Según su función quimiotáctica:

Los factores quimiotácticos son mediadores químicos solubles generados localmente en los sitios de daño tisular. Actúan como señales que atraen más leucocitos circulantes al foco inflamado, además de controlar la expresión de algunas moléculas de adhesión (83); los podemos clasificar en:

- Agentes quimiotácticos clásicos o inespecíficos, que atraen a todos los leucocitos en general: fragmentos C5a y C3a del complemento, moléculas lipídicas (LTB₄, PAF), etc.
- Quimiocinas, que atraen determinados subtipos de leucocitos de forma selectiva: por ejemplo, la interleucina-8 (IL-8), la *monocyte chemoattractant/chemotactic protein-1*(MCP-1), la eotaxina, etc.
- Citocinas, que promueven la migración leucocitaria sin ser propiamente quimiotácticas, es decir, no actúan directamente

sobre los leucocitos sino que hacen a las células endoteliales más adhesivas para éstos o inducen en diversos tipos celulares la liberación de otros mediadores. Entre ellas destacan las citocinas proinflamatorias como el TNF α o la IL-1.

c) Mediadores celulares:

En el proceso inflamatorio participan diversos componentes o mediadores celulares como (84):

- *Leucocitos*: además de liberar mediadores inflamatorios, son capaces de adherirse al endotelio, de migrar a su través y, en general, de fagocitar y destruir a los agentes patógenos.
- *Plaquetas*: liberan mediadores inflamatorios, pueden agruparse con leucocitos y activarlos participando en la resolución de la inflamación.
- *Células endoteliales*: sintetizan y liberan numerosos mediadores inflamatorios e interactúan con los leucocitos en la infiltración leucocitaria.

Una característica común además de su capacidad para liberar mediadores inflamatorios, es que presentan en su superficie las llamadas moléculas de adhesión celular (MAC), moléculas que facilitan las interacciones entre estos tres tipos celulares (83, 84).

d) Moléculas de adhesión celular (MAC):

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas de membrana que participan en las etapas que se suceden en el proceso inflamatorio y se coordinan perfectamente para asegurar la secuencia ordenada de interacciones celulares que supone este proceso (85, 86). Se clasifican en tres familias:

1- Familia de las selectinas

Las selectinas son glicoproteínas que se caracterizan por la presencia de un dominio de tipo lecitina en la porción amino-terminal (N-terminal) y que pueden o no expresarse en la superficie celular (87). Median interacciones intercelulares temporales, siendo responsables de la adhesión primaria o laxa que permite el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio (84). Hasta el momento se han identificado tres selectinas:

- *L-selectina*: se expresa de forma constitutiva en los leucocitos en reposo y es cortada de la membrana plasmática tras la activación de los mismos.
- *E-selectina*: está en la superficie celular del endotelio. La E-selectina es inducida por distintos mediadores inflamatorios como citocinas, toxinas bacterianas, etc.
- *P-selectina*: se almacena preformada en gránulos intracelulares específicos en las plaquetas (gránulos α) y también en las células endoteliales (cuerpos de Weibel-Palade); desde éstos puede movilizarse rápidamente a la superficie por diversos estímulos. La P-selectina se expresa constitutivamente pero queda almacenada para ser rápidamente translocada a la membrana plasmática por oxidantes, histamina, trombina, etc., y además, su expresión puede aumentar por algunas citosinas. La E- y la P-selectina de endotelio o plaquetas se unen a los leucocitos a través de su ligando PSGL-1 (87-90).

2- Familia de las integrinas

Las integrinas son glicoproteínas de membrana heterodiméricas, constituidas por una subunidad α y una β que se unen entre sí mediante enlaces no covalentes. Se expresan sobre todo en leucocitos

constitutivamente (86) pero además, en muchos casos, su expresión o su afinidad por su respectivo ligando puede incrementarse por distintos factores quimiotácticos u otros mediadores (91). Los ligandos de estas MAC son otras MAC o moléculas solubles (fibrinógeno, Factor de von Willebrand) (85). Participan en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, mediando fundamentalmente la adhesión firme de los leucocitos a las células endoteliales activadas, la migración y la quimiotaxis de los leucocitos hacia los sitios de inflamación (92); interaccionan a nivel intracelular con proteínas del citoesqueleto (como la actina) para integrar la información del medio extracelular con la actividad de la célula, acción de la cual deriva su nombre.

3- Superfamilia de las inmunoglobulinas

Estas MAC son proteínas transmembrana que tienen uno o más dominios extracelulares homólogos a las Igs. Entre ellas se encuentran moléculas como *intercellular adhesion molecule* ICAM-1, ICAM-2, *vascular cell adhesion molecule-1* VCAM-1, MAdCAM y *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1). Se localizan sobre todo en el endotelio y algunas, además, en plaquetas, leucocitos y otras células (85).

En general, son los ligandos endoteliales complementarios de otras MAC leucocitarias, sobre todo integrinas, y también se unen a proteínas de la matriz extracelular o a moléculas solubles (91). Están involucradas, como las integrinas, en los mecanismos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular que determinan la firme adhesión y transmigración de los leucocitos (93)

1.2.1.2 Etapas de la infiltración leucocitaria

En el proceso inflamatorio, y también en condiciones fisiológicas como parte de su función de vigilancia, los leucocitos deben abandonar el

torrente circulatorio, mediante un proceso que se denomina infiltración leucocitaria. Los leucocitos deben atravesar la monocapa de células endoteliales que recubre la pared interna de los vasos sanguíneos para pasar al espacio extravascular, donde realizarán sus funciones biológicas. Las MAC y los factores quimiotácticos son los principales mediadores en el proceso de infiltración leucocitaria, ya que, actuando directamente sobre los leucocitos, provocan la interacción de éstos con el endotelio vascular. Las MAC, como se explica anteriormente, promueven la interacción entre leucocitos y células endoteliales y matriz extracelular (93).

El proceso de infiltración leucocitaria, que abarca, pues, desde el contacto inicial de los leucocitos con el endotelio hasta que alcanzan el espacio extracelular, se ha simplificado en un modelo que predice tres etapas sucesivas y coordinadas: rodamiento, adhesión y migración. Se define como una cascada puesto que la interrupción de la etapa inicial impide las siguientes (83, 84, 93, 94):

1.2.1.2.1- Adhesión primaria y rodamiento

En primer lugar, las células endoteliales activadas aumentan su adherencia a los leucocitos (“los reconocen”). Este contacto inicial no es aleatorio, sino que constituye la adhesión primaria o laxa que enlentece el tránsito leucocitario y aumenta la posibilidad de una interacción más estrecha entre los leucocitos y el endotelio. Esta fase se denomina rodamiento leucocitario y es el paso limitante para las siguientes fases.

El proceso se inicia con la liberación de mediadores generados por el tejido dañado (histamina, trombina, PAF, TNF α , IL-1, etc.) que producen una rápida activación de las células endoteliales. En consecuencia, se producen sustancias quimiotácticas, y aumenta la expresión de determinadas MAC; principalmente las selectinas, que determinan la

interacción inicial leucocito-endotelio y el rodamiento leucocitario. Dicha interacción es reversible, si no se desencadenan los mecanismos de adhesión firme, los leucocitos volverán al torrente circulatorio (83, 95)

1.2.1.2.2- Activación y adhesión firme

Si el estímulo persiste, se produce la activación de los leucocitos en rodamiento, fenómeno aparentemente muy rápido que da lugar a la detención de los mismos de manera estable, produciéndose su adhesión firme al endotelio vascular. Median en esta etapa:

-Las sustancias originadas en el foco inflamatorio que, por la menor velocidad de los leucocitos en rodamiento, pueden interactuar con ellos y activarlos: pueden ser exógenas (fMLP) o endógenas (C5a, PAF, LTB₄, y otros agentes quimiotácticos).

-MAC: integrinas de la membrana leucocitaria (como las β 2) cuya expresión aumenta como consecuencia de la activación, y sus ligandos, las inmunoglobulinas (Igs) (93, 96).

1.2.1.2.3- Migración y quimiotaxis

Finalmente, se inicia la migración a través del endotelio (transmigración, migración transendotelial, diapédesis o extravasación) y la quimiotaxis, que es el movimiento unidireccional de los leucocitos a través del tejido hacia el foco inflamado, atraídos por concentraciones crecientes de agentes quimiotácticos originados en el foco. Este proceso lo regulan:

-MAC, tanto integrinas como Igs, que hacen posible la diapédesis.

-Los agentes quimiotácticos y determinadas quimiocinas, que forman un gradiente quimiotáctico que dirige la diapédesis y la migración a través del tejido (84).

1.2.3 La disfunción endotelial

El endotelio vascular, es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo. Es una capa unicelular que recubre la superficie interna de los vasos y que interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos como el mantenimiento de la hemostasia vascular, la permeabilidad de los vasos y el control de la presión del flujo sanguíneo (97).

Las células endoteliales liberan diferentes mediadores que intervienen en la regulación hemostásica y en el mantenimiento de la integridad vascular (Tabla 1) (98, 99).

Moléculas liberadas por células endoteliales	Función
Prostaciclina y óxido nítrico	Vasodilatación, inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria
Activador tisular del plasminógeno	Regulación de la fibrinólisis
Trombomodulina	Anticoagulante
Tromboplastina	Promueve la coagulación
Factor Von Willebrand	Promueve la adhesión plaquetaria y activación de la coagulación.
Endotelina	Vasoconstricción
Factor tisular	Promueve la coagulación
Receptor de la proteína C	Hemostasia
MAC: E-selectina, ICAM, VCAM..	Adhesión y migración leucocitaria

Tabla 1. Moléculas liberadas por las células endoteliales y su función (100).

Tras el daño o disfunción en la pared vascular y ante un estímulo inflamatorio, se desencadena todo un proceso por el cual las plaquetas se adhieren al endotelio vascular y se agregan entre sí para finalmente

formar un coágulo. De igual modo, en presencia de un endotelio disfuncionante se observa un aumento de expresión de las moléculas de adhesión celular (MAC) las cuales, cooperando con las moléculas quimiotácticas, son esenciales mediadores de las complejas interacciones celulares que facilitan la aproximación de leucocitos a la pared vascular contribuyendo al proceso trombótico y aterogénico.

En el proceso de aterosclerosis el primer paso consiste en la disfunción del endotelio desencadenada por diferentes factores (aumento de lipoproteínas de baja densidad, radicales libres producidos por el humo del tabaco, diabetes mellitus, etc.) que desencadenan una respuesta inflamatoria que implica la participación de monocitos/macrófagos y plaquetas (81). La aterogénesis, por tanto, resulta de la interacción entre la biología de la pared arterial y varios estímulos estresantes presentes en la circulación sanguínea. Los cambios más tempranos que tiene lugar en el endotelio suponen el comienzo de la acumulación de leucocitos mononucleares (monocitos, sobre todo, y linfocitos T) y de lípidos en el espacio subendotelial. El endotelio se hace más permeable a las LDL, que son oxidadas en el espacio subendotelial por las células endoteliales, las células de la musculatura lisa y los macrófagos. Las LDL oxidadas activan el endotelio que se vuelve procoagulante y pasa a expresar diferentes MAC, que junto con otros factores quimiotácticos atraen más leucocitos. Por otro lado, en el espacio subendotelial los monocitos transformados en macrófagos también atraen más leucocitos al foco aterosclerótico amplificando la respuesta inflamatoria (101). La lesión aterosclerótica precoz o estría grasa es por tanto, una lesión inflamatoria que consiste en un cúmulo de macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) y linfocitos T en la íntima, que se acompaña de proliferación de células musculares lisas. La progresión de la estría grasa da lugar a la

típica lesión neoíntima denominada placa fibrosa. A medida que progresa se introduce en el lumen lo que provoca el estrechamiento del vaso dando lugar a procesos isquémicos, o bien si se produce su rotura, puede ocluir otros vasos de menor calibre.

Del mismo modo, en las trombosis venosas, cuya fisiopatología se ha atribuido tradicionalmente a la triada de Virchow, el bajo flujo y el estasis venoso que se presenta especialmente cerca de las válvulas venosas, pueden provocar hipoxia y estrés oxidativo desencadenando la disfunción endotelial. Por tanto, si el endotelio intacto expresa en su superficie potentes antiagregantes plaquetarios, cuando es activado por el estrés oxidativo pasa a expresar diferentes receptores de adhesión de leucocitos y plaquetas por un lado, activando por otro lado, la cascada de la coagulación a través del factor tisular expuesto en la superficie endotelial y por diferentes leucocitos principalmente (102, 103).

1.2.2. LAS PLAQUETAS

1.2.2.1 Características generales

Las plaquetas son pequeñas células anucleadas provenientes de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos medulares. Tienen forma discoide biconvexa, de 2-4 μm de diámetro, que se adapta a las diferentes funciones que van a desempeñar (104). En sangre periférica de sujetos sanos, su número oscila entre $1,5-4 \times 10^8$ céls./ml con una tasa de producción diaria de $5,5 \times 10^7$ céls./ml día, y una vida media de 7-9 días, cuando desaparecen por envejecimiento o consumo en procesos fisiopatológicos. Circulan por el torrente sanguíneo ejerciendo un papel esencial en el mantenimiento de la hemostasia e integridad del endotelio vascular, pero además participan en los procesos inflamatorios, inmunitarios y en la metástasis tumoral (105, 106). Circulan de forma no

activa y al activarse expresan en su superficie diferentes moléculas que van a facilitar su interacción con otras plaquetas y/o leucocitos y su adhesión al endotelio vascular. Estas moléculas se almacenan en gránulos intraplaquetarios, que son principalmente:

- 1.1 Lisosomas. Contienen elastasas y otras proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular.
- 1.2 Gránulos α . Contienen diferentes citoquinas (RANTES, IL-8, etc.), factores de crecimiento (PDGF, VEGF, etc.), factores de coagulación (factor V, VII, etc.), de fibrinolisis (PAI-1) y del sistema inmune, así como moléculas de adhesión como P-selectina, trombospondina, fibronectina, PECAM.-1 y glicoproteínas (GP) Ib y α II β 3 (GIIb/IIa) entre otras (107).
- 1.3 Cuerpos densos. Contienen difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), serotonina y calcio entre otros, los cuales inducen la activación y agregación plaquetaria, vasoconstricción y liberación de citoquinas (108).

La membrana plaquetaria esta dividida en tres capas: una cubierta exterior o glicocálix, que contiene los diferentes receptores glicoproteicos; una segunda capa o bicapa fosfolipídica, esencial soporte de los factores de coagulación, y la capa más interna submembranosa, que está unida a las porciones transmembranosa de algunas glicoproteínas y contiene filamentos que forman parte del citoesqueleto. Las principales glicoproteínas (GP) de membrana son:

- GP IIb/IIIa (α IIb/ β 3 o CD41/CD61). Es el más abundante en la membrana plaquetaria, y la única integrina exclusiva de la plaqueta (109). Es el lugar de unión de diferentes proteínas de adhesión: fibrinógeno, fibronectina, factor de Von Willebrand, vitronectina,

trombospondina y colágeno. Su papel es esencial en la agregación plaquetaria, actuando como receptor del fibrinógeno (110).

- GP Ia/IIa ($\alpha 2\beta 1$). Es la segunda integrina más abundante en la plaqueta. Juega un papel crucial en la adhesión plaquetaria al ser receptor para el colágeno de la superficie endotelial (111).
- GP Ib/V/IX. Está compuesta por dos subunidades, α y β , unidas por puentes disulfuro. Forma complejos con otras GP de membrana y desempeña un papel fundamental en la hemostasia primaria, actuando como receptor de contacto de las plaquetas con el endotelio a través del factor de Von Willebrand. También esta descrita su participación en la interacción de las plaquetas con la trombina, ya que se ha visto que algunos anticuerpos antiGPIb inhiben la agregación y secreción plaquetaria inducida por trombina (112).
- GP IV (IIIb o CD36). Se encuentra en la superficie también de otras células y es receptor para varios ligandos como el colágeno, actuando en el proceso de adhesión (113).
- GP Ic-IIA. Puede actuar como receptor de la laminina, proteína de la estructura subendotelial del vaso (113).

En condiciones normales, el endotelio vascular libera potentes inhibidores de la adhesión y agregación plaquetaria como son el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂). Además las células endoteliales producen trombospondina, una molécula con actividad heparina, ADP-asa (que hidroliza la ADP) y componentes del sistema fibrinolítico, como el activador tisular del plasminógeno, la urocinasa y PAI-1 (114). Tras el daño en la pared vascular, y ante un estímulo inflamatorio, se desencadena todo un proceso por el cual las plaquetas sufren un cambio en su estructura se desgranulan y se adhieren al endotelio vascular

dañado agregándose a otras plaquetas, para finalmente formar un coágulo (115).

1.2.2.2 Las plaquetas en la hemostasia primaria

La adhesión al endotelio es la primera etapa de la hemostasia primaria. Esta mediada por distintos receptores que se expresan tanto en la superficie de las plaquetas como en el endotelio vascular, así como por diferentes proteínas de adhesión expresadas en la superficie endotelial tras el daño vascular, como son el factor de von Willebrand, el colágeno, fibronectina o laminina (116). El factor de von Willebrand es una glicoproteína de adhesión sintetizada por las plaquetas y células del endotelio (almacenada en los gránulos α y cuerpos de Weibel-Palade respectivamente) (117) y es, junto al colágeno, la principal proteína de adhesión entre las plaquetas y el endotelio (118). La GPIb α expresada de forma constitutiva en la superficie de las plaquetas inicia el proceso de adhesión plaquetario uniéndose al FvW y al colágeno (112). Inicialmente hay una interacción transitoria entre la GPIb α y el FvW que permite el contacto y rodamiento inicial de la plaqueta sobre el endotelio disfuncionante, para posteriormente, el colágeno expresado en su superficie, inducir la activación de la plaqueta y su adhesión firme mediante la unión con la glicoproteína mayoritaria en la superficie plaquetar (GPIIb/IIIa) y la GPVI (119, 120). La fibronectina y trombospondina interaccionan con las GPIc y IV respectivamente (121). Esta activación de las plaquetas permite una firme adhesión y la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Además, a la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria que proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la formación de trombina (122).

Todo este proceso ocurre gracias a la acumulación local de agonistas de la activación plaquetaria que son secretados desde las propias plaquetas adheridas al endotelio vascular, y que van a favorecer el reclutamiento de un mayor número de éstas. Entre estos agonistas de la activación se encuentran el ADP, el troboxano A₂, la epinefrina y la trombina (122). La liberación de ADP, liberado también por células endoteliales y eritrocitos, es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria y actúa mediante su interacción con receptores específicos localizados en la superficie de la plaqueta; uno acoplado a la proteína G_q (el P₂Y₁) y otro acoplado a G_i (P₂Y₁₂). Ambos receptores actúan de modo sinérgico en su activación. Mediante su unión al receptor P₂Y₁₂ inhiben la adenilato ciclasa y reducen la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) en la plaqueta, lo que facilita su activación (123, 124).

La etapa final del proceso es la activación de los receptores α IIb β 3, lo que va a posibilitar la unión del fibrinógeno y también del FvW, permitiendo el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas a través de α IIb β 3 (125, 126). De forma simultánea a todo este proceso, el factor tisular expuesto en la superficie endotelial inicia la cascada de coagulación (Figura 1), lo que dará lugar a la formación de trombina, otro importante inductor plaquetario, que contribuirá a la formación del trombo y de fibrina, y que facilitará la consolidación del mismo.

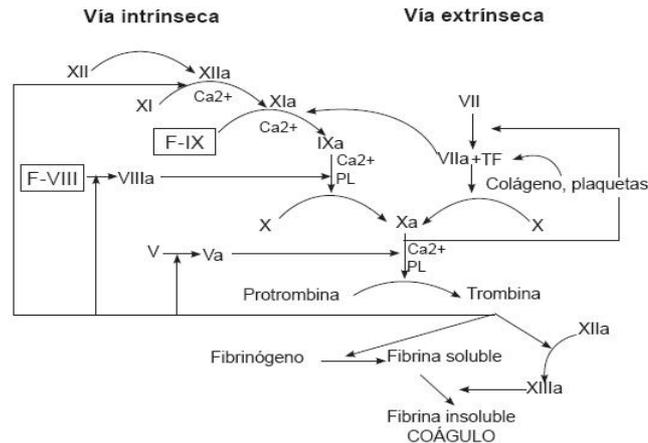


Figura 1. Cascada de la coagulación. El factor tisular se une al factor VII y lo activa para formar el complejo FT- VIIa, éste a su vez activa a sus sustratos, los factores X y IX. El factor Xa se une a su cofactor Va, y genera trombina que activa a los factores VIII, V, XI, XII y las plaquetas.

La activación de la plaqueta, por tanto, favorece la agregación plaquetaria a través de puentes de fibrinógeno, la liberación de mediadores tromboinflamatorios y la interacción de las plaquetas con el endotelio, el sistema de coagulación y los leucocitos (127).

1.2.2.3 Las plaquetas en la inflamación

Cuando el endotelio vascular se inflama, existe una disminución de la actividad antiplaquetaria de las prostaglandinas y las células endoteliales expresan en su superficie moléculas de adhesión plaquetaria tales como fibronectina, P-selectina, FvW, etc (128). La P-selectina (CD62), es de las primeras que se expresa rápidamente en la superficie endotelial tras el estímulo inflamatorio, siendo el mediador inicial en la interacción de las plaquetas y leucocitos con el endotelio a través del receptor de la P-selectina (PSGL-1). Durante el proceso de adhesión de las plaquetas activadas al endotelio vascular éstas interactúan con los leucocitos circulantes y los atraen hasta el foco de la lesión, aumentando además la capacidad de las células endoteliales para ello, para finalmente, llevarse a

cabo la infiltración leucocitaria detallada anteriormente (93). Tras la activación de las plaquetas, la P-selectina (CD62P) es traslocada desde los gránulos α a la membrana plaquetaria permitiendo la interacción con sus ligandos en las células endoteliales, leucocitos y otras células del sistema inmune. Así, las plaquetas forman agregados con los leucocitos promoviendo su reclutamiento, y lo hacen bien activando sus receptores de adhesión través del ligando de la P-selectina de la superficie leucocitaria (PSGL-1), o bien directamente siendo un puente de unión entre los leucocitos y el endotelio vascular (129). Se unen principalmente los leucocitos a las plaquetas porque la densidad de P-selectina en ellas es mayor que en la superficie endotelial (130). Esta unión entre P-selectina con su ligando leucocitario conlleva una serie de cambios conformacionales y señales intracelulares en el leucocito, que pasa a expresar en su superficie la proteína MAC-1 (integrina α M β 2, CD11b/CD18) y el FT, que aumenta su expresión en monocitos y células endoteliales en los estados inflamatorios (131). La proteína MAC-1 activada se une al factor Xa de la coagulación y al fibrinógeno, y favorece la diferenciación de los macrófagos, su quimiotaxis y su mayor adhesión endotelial (132). La GPIb α , como se ha descrito anteriormente, inicia el proceso de adhesión plaquetario, pero es también el receptor más conocido para la proteína MAC-1 (133). Los leucocitos, por tanto, se adhieren a las plaquetas a través del ligando de la P-selectina, pero se adhieren firmemente a través de la proteína MAC-1 al receptor GP1b α y a otros receptores presentes en la superficie de la plaqueta como JAM-3, ICAM-2, o bien a través de puentes con fibrinógeno (Figura 2).

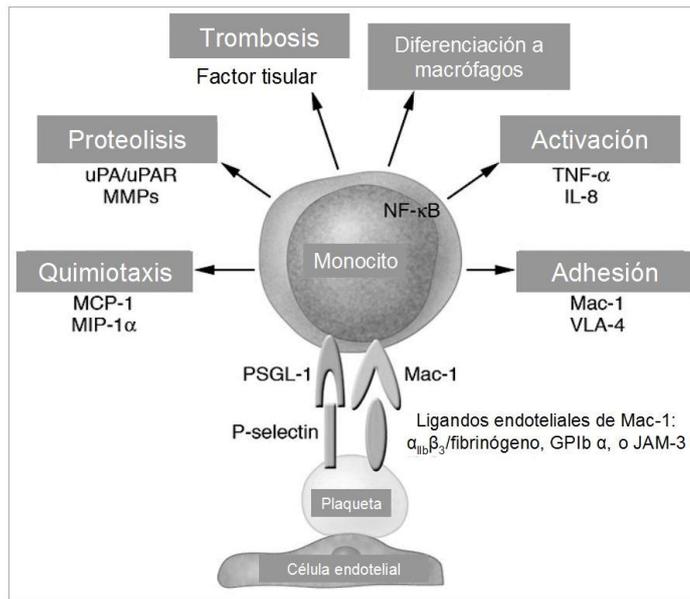


Figura 2. Unión de las plaquetas activadas a los leucocitos. Las plaquetas activadas se unen a los leucocitos a través de PSGL1 vía P-selectina y a través de MAC1 vía GP $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Se inicia entonces por parte de los monocitos la liberación de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, factor tisular y su diferenciación a macrófagos (134).

La IL-1 β , liberada por las plaquetas (135, 136), se ha identificado como el mayor activador inducido por plaquetas de las células endoteliales. Favorece la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), clave en la regulación del reclutamiento de monocitos en el tejido inflamado y en la aterosclerosis (137, 138), y que puede aumentar la expresión endotelial de moléculas como ICAM-1, VCAM-1 o $\alpha\text{V}\beta_3$ que promueven la adhesión de monocitos y neutrófilos (139). RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) es otra quimiocina liberada por las plaquetas que induce el reclutamiento de monocitos mediados por la P-selectina (140, 141). De igual modo, el factor de necrosis tumoral (TNF α), producido por monocitos/macrófagos activados, ayuda a amplificar la respuesta inflamatoria, favoreciendo también la activación y adhesión plaquetaria (142). Otra quimiocina

liberada por las plaquetas, y la más abundante, es el factor plaquetario-4 (PF-4/CXCL4). Esta quimiocina es liberada en altas concentraciones tras la activación plaquetaria, siendo expresada también por monocitos. Está implicada en múltiples procesos biológicos como la megacariopoyesis, angiogénesis, metástasis tumoral, las respuestas inmunitarias y la trombosis (143). Los mecanismos por lo que interviene en la trombosis no están del todo elucidados, pero se sabe que juega un doble papel en la coagulación, con un efecto dual pro- y anti- coagulante (144), siendo su acción protrombótica la que predomina (145). Por un lado, neutraliza la acción de moléculas heparin-like inhibiendo la actividad de la antitrombina III y favoreciendo la trombosis, y por otro lado, promueve la activación de la proteína C, potente anticoagulante (145). Esta característica para muchos se ha atribuido a los niveles de PF-4, sin que haya estudios concluyentes en los cuales se determine un rango normalidad. En combinación con RANTES induce el reclutamiento de monocitos. PF-4 también se ha visto que promueve la estimulación de monocitos y su diferenciación a macrófagos, y además favorece la aterogénesis por su capacidad para retener lipoproteínas (146, 147).

Las plaquetas también expresan en superficie el ligando soluble de CD40 (CD40L, CD154). CD40L es una GP almacenada en los gránulos α que tras la desgranulación plaquetaria se transloca a la superficie e incluso puede liberarse a plasma mediante la escisión proteolítica por la acción de la metaloproteasa-2 (MMP-2). Ambas formas, tanto la adherida como la soluble, interaccionan con CD40 expresado en linfocitos, neutrófilos, monocitos, células endoteliales, dendríticas, fibroblastos y otras plaquetas (148). La unión de CD40 de la superficie endotelial con CD40L expuesto en la superficie de las plaquetas activadas, promueve la expresión y liberación de moléculas implicadas en el proceso

inflamatorio como IL-8 y MCP-1 (149), y aumenta de la expresión en el endotelio de moléculas de adhesión celular tales como la E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, favoreciendo por tanto la adhesión leucocitaria al endotelio. Por otro lado, existen dos proteínas que regulan la interacción de las plaquetas con el endotelio, *platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) y *von Willebrand factor cleaving protease* (ADAMTS₁₃) (150, 151).

Algunas de estas moléculas descritas han servido de marcadores de la activación plaquetaria y han sido medidas en diferentes patologías. Así, se han detectado niveles elevados de P-selectina en la cardiopatía isquémica (152, 153), diabetes (154), arteriopatía periférica (155), etc. e incluso se ha utilizado como marcador pronóstico en el infarto agudo de miocardio (156). De igual manera, también se han detectado niveles elevados de CD40L en la cardiopatía isquémica (149), y el receptor GPIIb/IIIa y el anticuerpo monoclonal PAC-1 que se le une tras su activación, también han sido objeto de estudio en patología cardiovascular y síndrome metabólico (157, 158). Existen además otros marcadores de activación plaquetaria tales como el CD63 (LAMP-3) producido en cuerpos densos y lisosomas, micropartículas derivadas de las plaquetas (PMPs), el factor XIII de la coagulación o la fosfatidilserina entre otros (159).

La endoglina, también llamada CD105, es una glicoproteína de membrana que forma parte del complejo receptor TGF- β . Aunque expresada por macrófagos, precursores eritroides, sinciotrofoblastos de la placenta terminal y células del estroma, su expresión principal es en las células endoteliales de la vasculatura, por lo que es considerada un marcador endotelial (160, 161). La endoglina juega un papel muy

importante en la función y hemostasis del endotelio, siendo esencial en los procesos de angiogénesis y fibrogénesis (162).

1.2.3. QUIMIOCINAS

1.2.3.1 Consideraciones generales

La acumulación local de leucocitos, es un proceso complejo que requiere la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales de la microvasculatura. Está controlado fundamentalmente por las MAC, como se detalla en apartados anteriores, y por los factores quimiotácticos, capaces de dirigir el movimiento de los leucocitos al foco inflamado; entre estos factores quimiotácticos destacan las quimiocinas.

La palabra quimiocina es la abreviación con la que se designa a las “citocinas quimiotácticas” (en inglés, *chemokine*, de *chemotactic cytokine*), por su capacidad de inducir la migración selectiva de un determinado tipo de células. Por tanto, son capaces de atraer específicamente a diferentes tipos de leucocitos, tanto en fenómenos de inmunidad como en reacciones inflamatorias (163).

Las quimiocinas, como las citocinas, son proteínas de secreción producidas por leucocitos y células tisulares, bien de forma constitutiva o bien por inducción ante diferentes estímulos (citocinas, irritantes, antígenos y otros); sin embargo, son más pequeñas aún (8-17-kDa) y actúan a través de receptores acoplados a la proteína G (*G-protein-coupled receptors* o GPCR), típicos de agentes quimiotácticos leucocitarios (164).

1.2.3.2 Características estructurales

Las quimiocinas son proteínas pequeñas, de unos 70-130 aminoácidos (aa), glicosiladas o no y, en su mayoría, son secretadas. A medida que se

han ido encontrando nuevas moléculas, se ha hecho necesaria una nomenclatura sistemática para las quimiocinas y sus receptores. Consiste en el acrónimo relativo a la estructura (por ejemplo, “CXC”) seguido o bien de “L”, por ligando, en el caso de las quimiocinas, o bien de “R”, en el caso de los receptores.

En general, presentan cuatro residuos cisteína (cys) (165) en la porción N-terminal, a excepción de las linfotactinas- α y - β , que únicamente presentan dos, característica que es la base para su clasificación, unidas entre sí por dos puentes disulfuro (Cys 1^{3/4} Cys 3 y Cys 2^{3/4} Cys 4), lo que confiere a las quimiocinas su característico plegamiento tridimensional. Así, aunque tienen una identidad relativamente pequeña en su secuencia de aa, su estructura tridimensional muestra una marcada homología. Los puentes disulfuro son esenciales para su reconocimiento por el receptor y su actividad biológica (164, 166). De acuerdo con la posición relativa de las dos primeras cisteínas N-terminales, las quimiocinas se clasifican en cuatro subfamilias:

- *Subfamilia de las quimiocinas CXC (subfamilia α):*

Presentan las dos Cys separadas por un aminoácido variable. Su prototipo es la IL-8.

- *Subfamilia de las quimiocinas CC (subfamilia β):*

Tienen las dos Cys adyacentes, sin aminoácido intermedio. Su prototipo es la MCP-1.

Las quimiocinas C y CX₃C constituyen las dos subfamilias “menores”:

- *Subfamilia de las quimiocinas C (subfamilia γ):*

Presentan una sola Cys N-terminal (faltan la primera y la

tercera de las cuatro Cys). Las linfotactinas- α y - β son los dos únicos miembros de la subfamilia.

- *Subfamilia de las quimiocinas CX₃C (subfamilia δ):*

Las dos primeras Cys N-terminales están separadas por tres aa. La fractalquina o neurotactina o CX₃CL1 es el único representante de la subfamilia

Sólo dos quimiocinas, la CXCL16 y la fractalquina (CX₃CL1) son proteínas de membrana. La fractalquina/ CX₃CL1 es una de las pocas quimiocinas que, además de comportarse como factor quimiotáctico de células que expresan su receptor CX₃CR1 tales como monocitos, células NK o células T, actúa como molécula de adhesión, ya que es una glicoproteína de tipo mucina anclada en la membrana. Por otro lado, CXCL16 es otra quimiocina, con características semejantes a fractalquina ya que también es una quimiocina transmembrana, y se expresa en células endoteliales, células del músculo liso vascular, así como en macrófagos y células dendríticas (167, 168).

Como parte del objeto de estudio de esta Tesis haremos una descripción más detallada de la fractalquina y CXCL16.

1.2.4 FRACTALQUINA/ (CX₃CL1)

1.2.4.1 Consideraciones generales

La fractalquina (FRN) conjuntamente con CXCL16, son las únicas quimiocinas transmembrana. El gen que codifica la FRN se encuentra en el cromosoma 16q13, con genes de quimiocinas que pertenecen a la familia CC (169). Estructuralmente la fractalquina contiene múltiples dominios que la hacen diferente a otras quimiocinas (Figura 3).

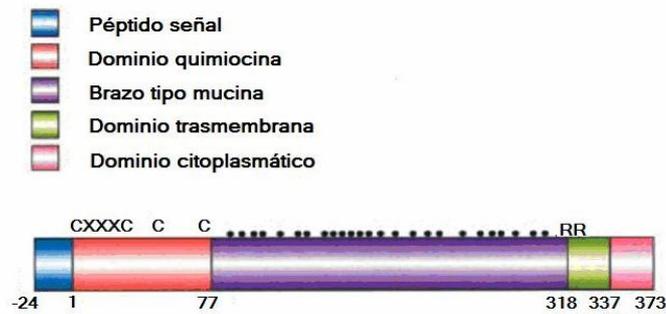


Figura 3. Estructura de la fractalquina. Es una proteína con 373 aa, distribuidos en múltiples dominios. Comenzando en el péptido señal que contiene el extremo N-terminal de la quimiocina (resíduos 1 a 76), el cual cuenta con tres aa entre los residuos de cisteína (CX₃C), el brazo tipo mucina (resíduos 77 a 317) que contiene repeticiones de residuos serina y treonina O-glicosados, el dominio transmembrana que abarca de los residuos 318 al 336, y el dominio intracelular con los residuos 337 al 373 (170).

La expresión de fractalquina aumenta en las células endoteliales por la acción de citocinas inflamatorias, como TNF α , IL-1 e INF γ . La conversión de proteína transmembrana a fracción soluble de la fractalquina (sFRN), resulta de la acción enzimática ejercida por la enzima convertidora de TNF α (TACE o ADAM17) y ADAM10 (171, 172) (Figura 4).

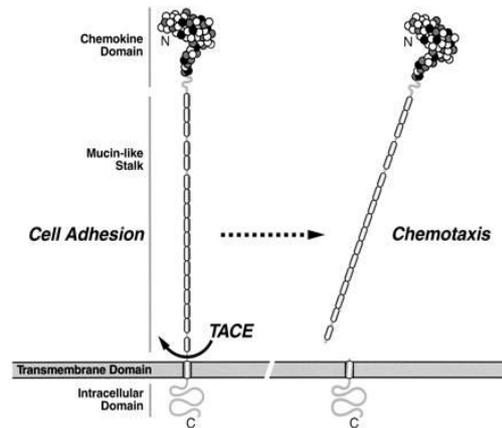


Figura 4. La formación de la fracción soluble de la fractalquina. Resulta de la acción enzimática ejercida por ADAM10 y ADAM17 (la enzima convertidora de $\text{TNF}\alpha$) (171)

En las células vasculares, los mediadores proinflamatorios estimulan la expresión de $\text{CX}_3\text{CL1}$, mientras que las ADAM10 y ADAM17 participan en el reciclaje de la fractalquina en la superficie celular. Es posible que en procesos inflamatorios severos, la expresión de las quimiocinas exceda a la producida en condiciones fisiológicas (constitutiva), aumentando la presentación de ligandos de quimiocinas en la pared vascular. En el primer paso del reclutamiento leucocitario, la acción de las metaloproteinasas incrementa la adhesión de leucocitos. Posteriormente, el corte proteolítico de la fractalquina mediado por las ADAM, termina con la unión celular, separación necesaria para que los leucocitos reclutados puedan iniciar el proceso de diapédesis y su posterior migración a través del endotelio (172). También el corte ejercido por ADAM10 y ADAM17, permite generar cantidades crecientes de quimiocinas, que crean el gradiente de concentración necesario para la migración leucocitaria hacia el sitio de inflamación. Una vez que se libera la fracción soluble, el segmento transmembrana sufre un proceso de proteólisis por la acción de α -secretasas, dando

origen a fragmentos implicados en la señalización intracelular (173). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de formación fractalquina soluble en el compartimiento intracelular.

1.2.4.2 Fractalquina como agente quimiotáctico

La fractalquina soluble es un agente quimiotáctico de monocitos, células NK y células T (174). Como el endotelio constituye la primera barrera para la migración leucocitaria, las propiedades de la fractalquina en las células endoteliales hacen pensar que pueda ser una importante vía de control para la extravasación leucocitaria en el foco inflamatorio (Figura 5a).

Su dominio tipo quimiocina presente en el extremo del brazo extracelular, le permite actuar como molécula de adhesión sin la necesidad de asociación con los proteoglicanos o de la actuación de otras moléculas de adhesión. Las células que expresan el receptor CX₃CR1 (monocitos, macrófagos, células T y NK) (167) se unen rápidamente y con gran afinidad a la fractalquina inmovilizada, o a las células que expresan fractalquina, tanto en condiciones estáticas como en condiciones fisiológicas de flujo (Figura 5b). Adicionalmente a su efecto en la adhesión, la fractalquina al interactuar con su receptor activa señales de transducción dependientes de proteína G, que aumentan la avidéz de las integrinas por sus ligandos.

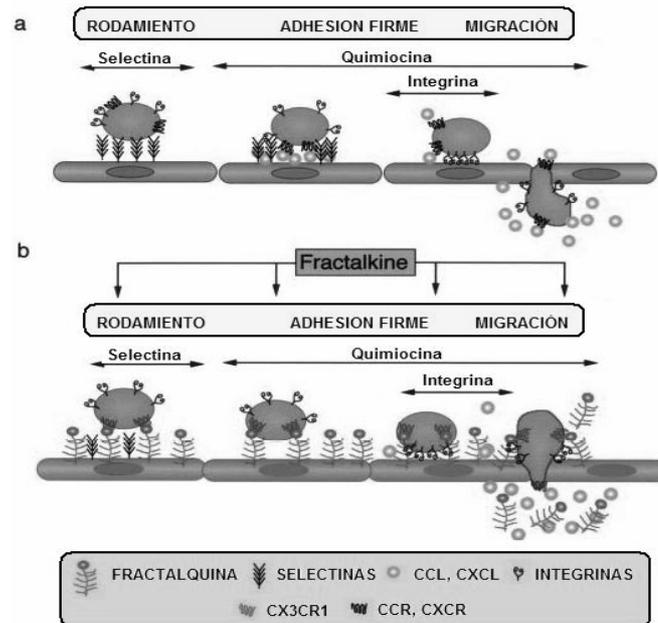


Figura 5. Modelo clásico y vías de la fractalquina en la cascada de adhesión. La migración leucocitaria desde la circulación hacia los tejidos sigue una serie de pasos: a) La vía clásica se inicia con la adhesión débil y el rodamiento mediado por selectinas. Los leucocitos activados por quimiocinas expresan integrinas que conducen a la adhesión firme, por último los leucocitos migran siguiendo el gradiente quimiotáctico. En la vía alternativa (b), la fractalquina unida a la membrana de las células endoteliales captura leucocitos, sin la participación de selectinas o integrinas. La interacción de la fractalquina con su receptor CX₃CR1 incrementa la expresión de integrinas, y por tanto la adhesión firme. Los leucocitos migran siguiendo el gradiente quimiotáctico (170).

1.2.4.3 Fractalquina y plaquetas

La fractalquina unida a la membrana de las células endoteliales captura leucocitos a través de su receptor CX₃CR1. De igual modo, interactúa con las plaquetas que expresan su receptor favoreciendo su adhesión al endotelio y su desgranulación con la expresión de P-selectina. La P-selectina expresada en la superficie de la plaqueta, dependiente de fractalquina, es fundamental para la adhesión del leucocito al endotelio inflamado, pero no es esencial para la adhesión

plaquetaria y su desgranulación per sé, ya que cuando se inhibe la acción de la fractalquina no hay efectos relevantes en la adhesión plaquetaria. En cambio, el rolling y adhesión leucocitaria al endotelio activado si ocurre principalmente en sitios con gran acúmulo plaquetario, de hecho la inhibición de la adhesión plaquetaria sí se acompaña de una reducción de leucocitos adheridos (175).

1.2.5. CXCL16

1.2.5.1 Consideraciones generales

La quimiocina CXCL16, es una quimiocina perteneciente a la subfamilia de “CXC” que posee 254 aminoácidos. El gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 17 (168). Inicialmente fue descrita como receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL), fosfatidilserina, sulfadextrano o bacterias, bajo el nombre SRPOX (*scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*) por su capacidad para unirse específicamente, internalizar y degradar las LDL oxidadas (176). Se le atribuye un papel importante en la aterosclerosis al encontrarse niveles elevados de CXCL16 en las placas ateroscleróticas (177-180).

Se expresa, al igual que la fractalquina, como molécula transmembrana y en forma soluble. La forma transmembrana está compuesta por un dominio CXC, un dominio transmembrana y una porción citoplasmática. Actúa como molécula de adhesión celular para células que expresan su receptor CXCR6 (también denominado BONZO, STRL33 y TYMSTR), como las células T CD8 activadas y células NK, macrófagos, células dendríticas y células del músculo liso (172,181). La forma soluble, que representa el dominio extracelular de la quimiocina transmembrana, la cual es escindida por acción de las metaloproteasas ADAM 10 y ADAM

17 (182, 183) actúa en cambio, induciendo la quimiotaxis de las células leucocitarias que expresan CXCR6, promoviendo así la infiltración leucocitaria detallada anteriormente (184).

La quimiocina CXCL16 se expresa en diferentes células inflamatorias como en linfocitos, macrófagos células dendríticas, células endoteliales y células musculo liso vascular (185-188) y su expresión, al igual que fractalquina, es inducida por citoquinas inflamatorias como $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ (183).

1.2.5.2 CXCL16 como agente quimiotáctico

La interacción de CXCL16 y su receptor CXCR6 está implicada en múltiples procesos biológicos como el tráfico leucocitario, la adhesión celular, la supervivencia celular, la regeneración muscular, el desarrollo cerebral, la inflamación crónica y la inmunidad antitumoral (189, 190). Es importante el papel que ejerce en la progresión y metástasis tumoral habiéndose encontrado niveles aumentados de CXCL16 en pacientes con cáncer (191, 192).

Estudios recientes describen a esta quimiocina como un marcador asociado a la inflamación y a la progresión de la aterosclerosis coronaria (193-195) observándose en diferentes publicaciones la relevancia de la expresión endotelial de CXCL16 en las zonas propensas al desarrollo de la lesión aterosclerótica (196). Como mediador en la respuesta inflamatoria ejerce de factor quimotáctico de leucocitos hacia el foco inflamatorio, al igual que fractalquina. Actúa reclutando células del sistema inmune que expresan CXCR6 como células T, monocitos y fibroblastos, observándose además como en ausencia de su receptor se ve reducida la infiltración leucocitaria (197).

1.2.5.3 CXCL16 y plaquetas

Las plaquetas intervienen en la adhesión leucocitaria al endotelio expresando en su superficie diferentes receptores para quimiocinas (198). Estudios recientes han observado que CXCL16 y su receptor CXCR6 se expresan en la superficie de las plaquetas favoreciendo la activación y adhesión plaquetaria al endotelio (199, 200) y promoviendo la liberación por parte de las plaquetas de mediadores de la inflamación (200). Por tanto, hay un mayor reclutamiento de leucocitos a través de la activación plaquetaria y por la unión de CXCL16 a su receptor CXCR6 leucocitario (201). Además, la expresión de CXCL16 se incrementa tras la activación plaquetaria mediada por agonistas de la activación como es el ADP (202).

Hasta la fecha, son escasos los estudios en los cuales se realice una caracterización exhaustiva de los niveles circulantes de quimiocinas y de sus receptores en los pacientes con trombosis venosa y que correlacionen estos marcadores inflamatorios con parámetros clínicos, así como del papel que puedan desempeñar las plaquetas en la amplificación de la respuesta inflamatoria en estos pacientes.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Hipótesis

La hipótesis del presente estudio considera que la asociación entre patología arterial y venosa podría ser consecuencia de una disfunción endotelial que contribuya a un estado proinflamatorio en estos pacientes.

Objetivo

1. Estudiar la presencia de arteriosclerosis subclínica en los pacientes con antecedentes de TVP mediante la medida del grosor de la íntima-media carotídea.
2. Determinar los niveles de diferentes quimiocinas y marcadores de inflamación en el plasma en los pacientes con antecedentes de TVP.
3. Estudiar *in vitro* bajo condiciones dinámicas de flujo la adhesividad al endotelio arterial y venoso de los leucocitos de los pacientes con antecedentes de TVP.
4. Investigar el papel de la fractalquina y de su receptor CX₃CR1 en la adhesividad de los leucocitos al endotelio vascular en los pacientes con antecedentes de TVP.
5. Analizar la posible implicación de las plaquetas en la adhesividad de los leucocitos al endotelio vascular en los pacientes con antecedentes de TVP.
6. Investigar el papel de CXCL16 y de su receptor CXCR6 en la adhesividad de los leucocitos al endotelio vascular en los pacientes con antecedentes de TVP.

3. METODOLOGÍA

Los siguientes estudios se han llevado a cabo siguiendo los acuerdos de la Declaración de Helsinki, además fueron aprobados por el Comité Ético Institucional del Hospital Clínico Universitario de Valencia y cada paciente firmó el consentimiento informado para su realización.

3.1 SUJETOS DEL ESTUDIO

3.1.1 Criterios de inclusión y exclusión

Se definió la población en estudio trazando como criterios de inclusión a los sujetos con edad comprendida entre los 18 y 50 años que hubieran presentado un episodio de trombosis venosa profunda (confirmada mediante eco-Doppler) en los últimos 5 años, siendo criterio de exclusión:

- Negativa a participar en el estudio.
- Presencia de enfermedad maligna o crónica.
- Estudio de trombofilia congénita y/o anticuerpos antifosfolípido positivo.
- Tratamiento anticoagulante o antiagregante en el momento de la selección o retirado en un periodo inferior a los 6 meses.
- Presencia de embolia de pulmón confirmada mediante TAC helicoidal o gammagrafía pulmonar.
- Presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia)
- Disfunción grave de algún órgano incluyendo: Insuficiencia cardiaca, EPOC o neumopatía severa, insuficiencia renal moderada-severa (aclaramiento de creatinina inferior a 50 ml/min); Disfunción cognitiva grave o secuelas graves de accidente cerebrovascular previo; Enfermedad arterial periférica estadios III/IV de

Leriche-Fontaine; Insuficiencia hepática moderada-severa (Child-Pugh B o C).

- Antecedentes personales de eventos cardiovasculares incluyendo: síndrome coronario agudo o angina de pecho, accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, claudicación intermitente.
- Trastornos psiquiátricos que dificulten la adherencia al tratamiento y la participación en el estudio.
- Embarazo y lactancia.
- Obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$)

Se seleccionó una población control de sujetos sanos (n=23) con edad igualmente comprendida entre los 18 y 50 años sin antecedentes de episodio trombótico y mismos criterios de exclusión. Los sujetos fueron reclutados entre los trabajadores sanitarios que fueron a realizarse un examen de salud en el Servicio de Asuntos laborales del Hospital Clínico Universitario de Valencia y médicos internos residentes voluntarios del mismo Hospital.

3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

3.2.1 Medida antropométricas de índice de masa corporal (IMC) (peso (Kg)/ talla (m^2)) y de circunferencia de cintura y cadera

La medición se llevó a cabo con el sujeto sin ropa o con una vestimenta ligera, de pie con los pies juntos y los brazos en los costados, estando la cinta métrica horizontal y alrededor de toda la circunferencia. En la zona de la cintura más estrecha, es decir, debajo de la caja torácica y por encima del ombligo al final de una respiración normal, para la medición de la cintura y en el nivel de máxima extensión de las nalgas y a nivel de los trocánteres para la medición de la cadera.

Se consideró obesidad un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y sobrepeso un $25 \leq IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ y obesidad abdominal un perímetro abdominal igual o superior a 102 cm en varones y a 88 cm en mujeres de acuerdo con los criterios ATPIII (203).

3.2.2 Medición clínica de presión arterial

Llevada a cabo mediante un dispositivo semiautomático (OMRON M6) utilizando un manguito apropiado según la circunferencia del brazo. La medida de la presión arterial se realizó siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) (204). Se clasificaron como hipertensos o normotensos de acuerdo a las guías de la sociedad europea de hipertensión arterial (204).

3.2.3 Determinación del grosor de la íntima-media carotídea

De forma manual mediante ecografía-Doppler utilizando una sonda lineal de alta frecuencia (12 Mhz) y utilizando el ecógrafo Pro-Sound Alpha-10 de Aloka (6-22-1, Mure, Mitaka-shi, Tokyo 181-8622 Japan), siendo realizada de acuerdo con el consenso de Mannheim (205).

Se realizó la medición en la pared posterior de la arteria carótida común a 1.5 cm de la bifurcación carotídea, tomándose tres mediciones: anterolateral, mediolateral y posterolateral, y estudiándose la bifurcación carotídea y el inicio de la carótida interna y externa en busca de placas.

3.2.4 Echo-tracking carotídeo

Por medio de un sistema de radiofrecuencia se determinó en tiempo real la distensibilidad de la arteria carótida a 1.5 cm de la bifurcación, valorándose los siguientes parámetros de rigidez arterial: módulo de elasticidad-deformación (E_p); parámetro de rigidez β ; *Compliance* arterial (AC); índice de aumento del pulso local (AIx carotídeo); Velocidad de onda de pulso local (PWV_{local}). También se registraron el diámetro máximo y el diámetro mínimo del vaso.

3.2.5 Determinación de los parámetros bioquímicos

Se extrajo sangre venosa tras un mínimo de 8 horas de ayuno. Las determinaciones analíticas incluían: hemograma, coagulación y bioquímica completa con perfil renal, perfil lipídico, perfil glucémico con HbA1c, y bioquímica básica con urea, creatinina y electrolitos, reactantes de fase aguda (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular, ferritina) y factores conocidos de riesgo trombótico (homocisteína, estudio de trombofilia congénita, anticuerpos antifosfolípido). El aclaramiento de creatinina ha sido medido mediante la fórmula de Crockoft-Gault y el filtrado glomerular estimado mediante la fórmula MDRD4.

3.3 ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES HUMANOS

3.3.1 Obtención de cultivos de células endoteliales humanas

Para la obtención de células endoteliales de arteria o de vena de cordón umbilical humano (HUAECs o HUVECs), se emplearon cordones umbilicales siendo indispensable no haber transcurrido más de 12 horas desde el parto. Se empleó el método de la colagenasa (Jaffe y col., 1973). El cordón se limpió por fuera y por dentro con PBS a 37°C, y se perfundió la vena o la arteria con colagenasa (1 mg/ml a 37°C). Transcurridos 20 minutos, se recogió el contenido, se lavó de nuevo el vaso del cordón con medio (con suero fetal bovino) y se centrifugó a 1100 rpm, 7 minutos a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio específico EBM-2 suplementado con EGM-2 y 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células obtenidas se cultivaron en un frasco de cultivos celulares de 25 cm², hasta llegar a confluencia. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y cultivadas en las correspondientes placas o frascos de cultivos para realizar cada

experimento. Antes de la realización de cada experimento, las células se incubaron durante 16 horas con medio EBM-2 con 1% de FBS, que se mantuvo durante los distintos tratamientos.

3.3.2 Estudios con la cámara de flujo

Para este estudio se empleó la técnica de la cámara de flujo, ya que permite la visualización de la adhesión celular bajo condiciones dinámicas de flujo y así mimetiza las condiciones fisiológicas. Para ello, se sembraron HUAEC y HUVEC en placas de 35mm de diámetro recubiertas de fibronectina (concentración 5,5 µg/ml). Una vez alcanzada la confluencia y tras el tratamiento correspondiente de las células, las placas se colocaron en una cámara de flujo paralelo (*Dynamic flow assay in a parallel plate flow chamber, GlycoTech flow, EEUU*).

El sistema de la cámara de flujo consiste en una cámara que se acopla a las placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Esta cámara tiene tres puntos de inserción. Dos de estos puntos están enfrentados, de modo que se les inserta una goma de silicona y forman un canal cerrado, por el que se hace pasar la suspensión que contiene las células sanguíneas o la sangre entera. El tercer punto de inserción se acopla a una bomba de vacío. De este modo, en la cámara se crea un canal de flujo sobre la monocapa endotelial, y mediante la bomba de succión se establecen las condiciones experimentales de velocidad de perfusión. Se consigue, por tanto, emular las condiciones humanas de flujo sanguíneo sobre el endotelio.

La visualización de los eventos de adhesión celular, se realiza a través de un microscopio invertido de contraste de fases donde las interacciones se observan utilizando un objetivo 20x y un ocular 10x (*Microscopio Axio Observer A1 Zeiss, Thornwood, NY*).

Antes de comenzar cada ensayo se perfunde una solución de HBSS (Lonza Ibérica, España) sin calcio y magnesio, atemperada a 37°C, para

ajustar el flujo a 0,156 ml/min (que corresponde a un estrés de rozamiento de 1 dina/cm²). A continuación, se perfunde la solución de sangre entera de pacientes jóvenes con antecedentes de TVP o sujetos control, diluida 1/10 en HBSS con calcio y magnesio, durante 5 minutos. A continuación, se graban al menos 5 campos durante 10 segundos cada uno, para su posterior análisis. Aquellos leucocitos que establecen un contacto estable con la monocapa endotelial durante al menos 10 segundos se consideran como adheridos. Se contabilizan las células adheridas mientras el medio de perfusión sigue en continua perfusión.

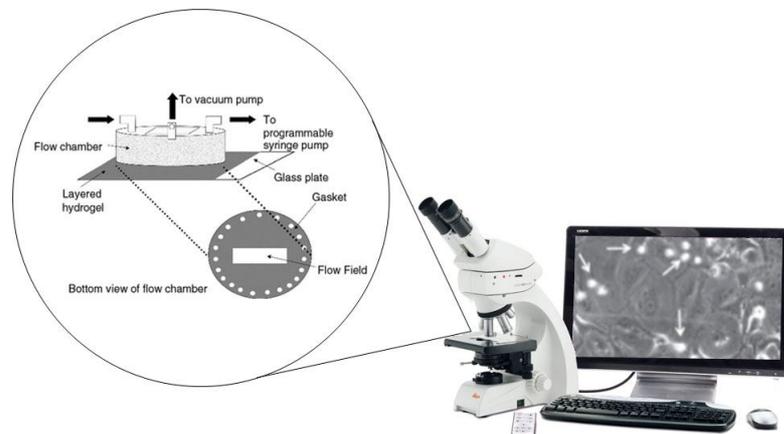


Figura 6. Sistema de la cámara de flujo paralelo.

3.3.3 Procedimiento experimental del estudio

Para la determinación de las interacciones leucocito-endotelio se incubaron HUAEC y HUVEC con TNF α (20 ng/mL) durante 4 h.

- En un primer estudio se perfundió la sangre sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 minutos, a una velocidad de 1 dina/cm² y posteriormente se tomaron las medidas de adhesión leucocitaria.

- En el segundo estudio, el procedimiento fue similar, pero con el fin de estudiar la implicación de fractalquina y CXCL16 en la acumulación

leucocitaria inducida por TNF α , diez minutos antes de realizar el experimento las células HUVEC y HUAEC se pretrataron con:

- anticuerpo MOPC-21 (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich, EEUU), empleado como control.
- anticuerpo monoclonal neutralizante de la función fractalquina (5 μ g/ml, clon 81506, IgG₁, R&D Systems, EEUU), para bloquear el dominio extracelular de la misma.
- anticuerpo monoclonal neutralizante de la función de CXCL16 (5 μ g/ml, IgG1, R&D Systems, EEUU).

Posteriormente se perfundió la sangre de los pacientes/controles, diluida 1/10 con HBSS con calcio y magnesio, durante 5 minutos a la presión de 1 dina/cm² para realizar a continuación las medidas de adhesión leucocitaria.

A continuación, se repitieron los experimentos con sangre tratada con EDTA, con el fin de ver la implicación de las plaquetas en la interacción leucocito- endotelio. Para ello, parte de la sangre de cada paciente o control, fue pretratada con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 10mM, durante 15 min a 37° C previo al experimento.

3.4 ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células. Una de las aplicaciones más comunes es la separación celular según el subtipo o el marcador de expresión. Este proceso es conocido como análisis FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (206). La suspensión de células se hace pasar por el citómetro (*BD FACSVerserTM*, *BD Biosciences, EE.UU*) a través de un pequeño orificio, de modo que cuando las células salen lo hacen de forma

alineada por un sistema de fluido formando parte de una corriente continua. Sobre esta corriente se hace incidir un haz de luz láser cuya dispersión y reflexión son analizados en duración, intensidad y espectro permitiendo analizar las células de manera individualizada.

Un primer análisis básico determina dos parámetros: el *Forward Scatter Channel* o detector de Dispersión Frontal (FSC), que proporciona información sobre el tamaño de las partículas, y el *Side Scatter Channel* o detector de Dispersión Lateral (SSC), que analiza la complejidad celular o contenido granular. Si además las partículas están asociadas a diferentes fluorocromos se puede llevar a cabo un análisis cuantitativo e identificativo mayor al irradiar una longitud de onda mayor, todo ello recogido en un detector (Figura 7).

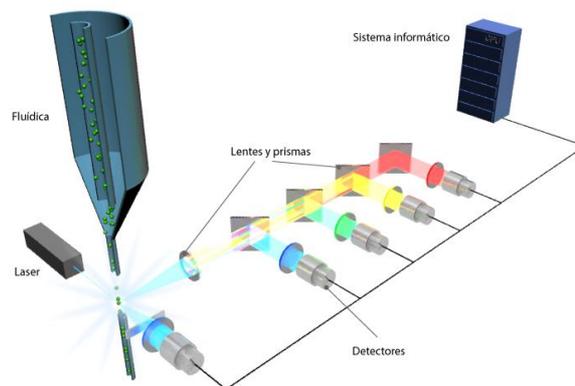


Figura 7. Esquema citómetro de flujo. Una vez las partículas pasan por el sistema de fluido, el láser las excita. La radiación de cada molécula pasa por diversos filtros para eliminar las longitudes de onda no deseadas y es enviada a detectores.

3.4.1 Procedimiento experimental del estudio

Para los estudios de citometría de flujo, se extrajo una muestra de sangre de los pacientes con antecedente de trombosis venosa y del grupo control. Las muestras de sangre fueron recogidas con citrato sódico

(3.5%) como agente anticoagulante (*BD Vacutainer, Beckton Dickinson and Company, EE.UU*).

Se diluyeron las muestras con tampón PBS. Una vez elaboradas las diluciones, se añadió a cada tubo los anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos correspondientes. A continuación, se agitaron suavemente y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el periodo de incubación, se añadió tampón de lisis 1X (*BD FACS Lysing Solution 10X, BD Bioscience, EE.UU*) a cada tubo para lisar los eritrocitos y fijar las células. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo. En el caso del experimento plaquetario, no es necesario incubar con el tampón de lisis puesto que las plaquetas son elementos que se activan con gran rapidez.

Para analizar los resultados obtenidos se utilizó el programa analítico FlowJo (*FlowJo Enterprise, EE.UU*).

3.4.2 Estudio de las plaquetas

3.4.2.1- Determinación de la activación plaquetaria

En primer lugar se llevó a cabo la identificación de las plaquetas mediante la determinación de su morfología según tamaño y complejidad (FSC vs SSC), seleccionándose poblaciones CD41⁺, siendo las plaquetas los elementos formes sanguíneos de menor tamaño.

Anticuerpo	Células
CD41 ⁺	Plaquetas
CD41 ⁻	Restos celulares

Plaquetas

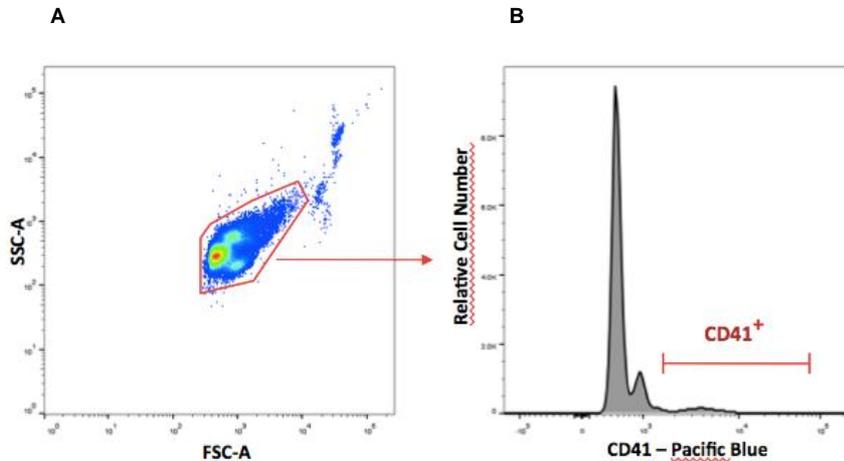


Figura 8. Estrategia de “gating” para las plaquetas. Las plaquetas fueron seleccionadas por un SSC y FSC en escala logarítmica (A). Posteriormente se utilizó el marcador CD41, positivo en población plaquetaria (B).

Tras la identificación de las plaquetas se determinó el grado de activación plaquetaria mediante análisis de los marcadores P-selectina (CD62-P) y PAC-1. En primer lugar, se diluyeron 100 μ l de sangre citratada en 900 μ l de tampón glucosa (1 mg/ml glucosa en 0,35% PBS/BSA). Posteriormente se incubaron, en dos tubos de 1,5 ml, 20 μ L de la sangre diluida con:

- 2,5 μ L de un anticuerpo frente a PAC-1 conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Clon PAC-1, IgM, BD Bioscences, EEUU) y 1,25 μ L de anticuerpo frente a CD41 conjugado con Pacific Blue (Clon HIP8, IgG 1, Immunostep, España) por un lado,
- 1,25 μ L de anticuerpo frente CD62P conjugado con aloficocianina (APC) (Clon P.seK02.22, IgG2b, Immunostep, España) y 1,25 μ L de anticuerpo frente a CD41 conjugado con Pacific Blue, por otro.

Posteriormente las muestras se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min, transcurrido el cual, se diluyeron con 500 μ L de tampón glucosa y se procedió a su análisis. Las muestras fueron analizadas con el citómetro BD FACSVerse (BD Beckman-Coulte) utilizando el software Flow Jo v.10. Se adquirieron 100.000 eventos, compensándose las muestras utilizando la herramienta del citómetro de compensación automatizada. La estrategia de gating para la determinación plaquetaria fue la descrita anteriormente mediante la determinación morfológica según su tamaño y complejidad (FS vs SS) en escala logarítmica y seleccionándose poblaciones CD41⁺, determinándose los niveles de CD62P y PAC-1.

3.4.2.2- Determinación de la expresión plaquetaria de CXCR6 y CXCL16

Para la determinación de la expresión de CXCR6 y CXCL16 en la superficie de las plaquetas, se incubaron 10 μ l de sangre citratada con:

- 1 μ L de anticuerpo frente a CD18 (CXCR6) marcado con ficoeritrina (PE) (clon 56811, IgG2B, R&D Systems) y 1 μ L de anticuerpo frente a CD41 Pacific Blue (Clon HIP8, IgG1, Immunostep) por un lado,
- 1 μ L de anticuerpo frente a CXCL16 marcado con PE (clon 256213, IgG2A, R&D Systems) y 1 μ L de anticuerpo frente a CD41, por otro.

Las muestras con la sangre citratada y con los anticuerpos descritos anteriormente, se incubaron durante 30 min a TA y en oscuridad. Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con 200 μ L de la solución comercial BD FACS LYSING SOLUTION a TA durante 15 minutos. A continuación, se analizaron en el citómetro BD FACSVerse (BD Beckman-Coulte) utilizando el software Flow Jo v.10. Se adquirieron

100.000 eventos, compensándose las muestras utilizando la herramienta del citómetro de compensación automatizada. Una vez transcurrido el periodo de incubación se determinó la morfología con FS versus granularidad (SS) en escala logarítmica y se seleccionaron poblaciones CD41⁺ y se determinaron los niveles de CD186 (CXCR6) y CXCL16.

3.4.2.3- Determinación de la expresión plaquetaria de CX₃CR1

Para la determinación de la expresión de CX₃CR1 en la superficie de las plaquetas de la misma población de sujetos seleccionados, se incubaron 10 µl de sangre anticoagulada con citrato con anticuerpo frente CX₃CR1 marcado con FITC (clon 528728, IgG₁, R&D Systems, EEUU) y 1 µL de anticuerpo frente a CD41 Pacific Blue (Clon HIP8, IgG₁, Immunostep).

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, adquiriéndose 100.000 eventos. Una vez transcurrido el periodo de incubación, para la estrategia de gating se determinó igualmente la morfología con FS versus SS en escala logarítmica y se seleccionaron poblaciones CD41⁺ y se determinaron los niveles de CX₃CR1.

3.4.3 Estudio de las poblaciones leucocitarias

3.4.3.1-Determinación de la expresión leucocitaria de CD186 (CXCR6), CXCL16 y CX₃CR1

En primer lugar se determinaron las diferentes poblaciones leucocitarias presente en las muestras de sangre utilizando los siguientes anticuerpos.

Anticuerpo	Población celular
CD14 ⁺	Monocitos
CD3 ⁺	Linfocitos T
CD14 ⁺ CD41 ⁺	Monocitos + Plaquetas
CD3 ⁺ CD41 ⁺	Linfocitos T + Plaquetas

Tabla 2. Anticuerpos para la detección de células polimorfonucleares

Monocitos

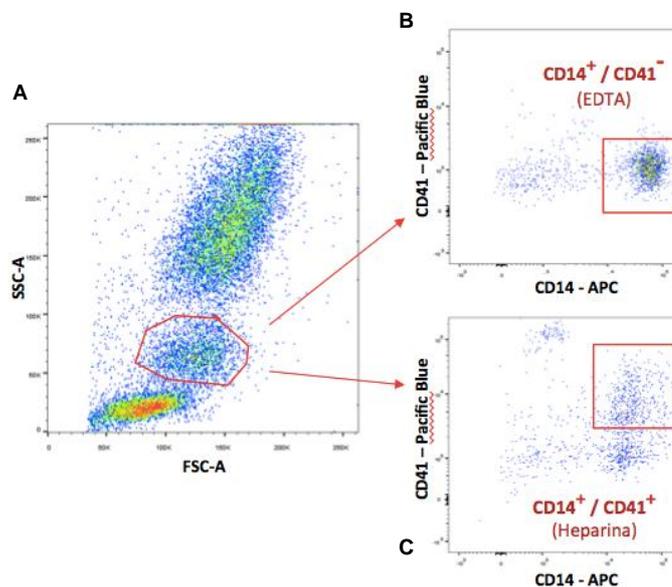


Figura 9. Estrategia de "gating" de monocitos. Los monocitos fueron seleccionados por un SSC y FSC en escala logarítmica (A). Para su determinación se utilizó el marcaje CD14. En sangre tratada con EDTA, la población no unida a plaquetas se seleccionó como CD14⁺/CD41⁻ (B). En sangre heparinizada, los monocitos asociados a plaquetas fueron CD14⁺/CD41⁺ (C).

Linfocitos

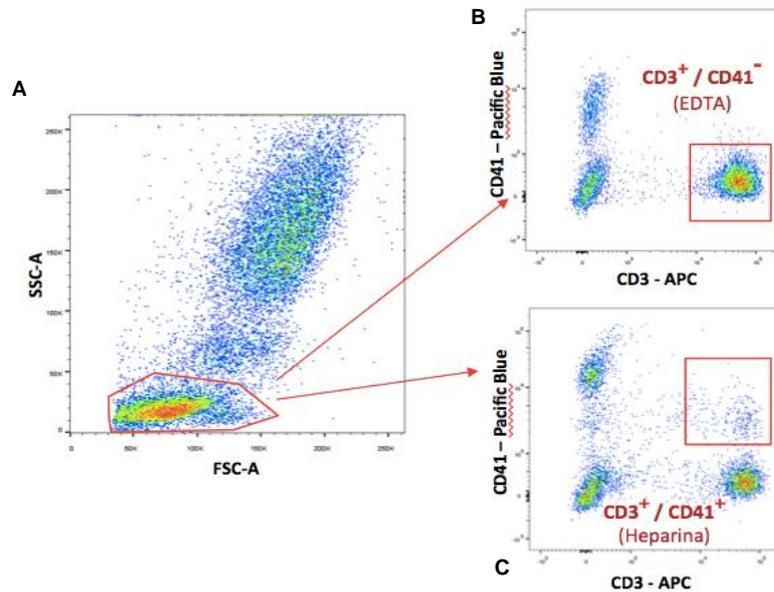


Figura 10. Estrategia de "gating" de linfocitos. Los linfocitos fueron seleccionados por un SSC y FSC en escala logarítmica (A). Para la determinación de monocitos se utilizó el marcador CD3, siendo la población de linfocitos CD3⁺. En sangre tratada con EDTA, la población no unida a plaquetas se seleccionó como CD3⁺/CD41⁻ (B). En sangre heparinizada, los monocitos asociados a plaquetas fueron CD3⁺/CD41⁺ (C).

Para la determinación de la expresión de CD186 (CXCR6), CXCL16 y CX₃CR1 en las distintas poblaciones leucocitarias, se hizo un experimento con sangre heparinizada, observándose los leucocitos unidos a plaquetas, y paralelamente, otro en sangre tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 10 mM, durante 15 min a 37 °C), y por lo tanto, sin plaquetas adheridas. Para ello, se incubaron 10 µl de sangre anticoagulada con heparina, y paralelamente con EDTA, con el anticuerpo correspondiente frente CX₃CR1 marcado con FITC (clon 528728, IgG₁, R&D Systems, EEUU), frente a CXCR6 marcado con PE (R&D Systems) y frente a CXCL16 marcado con PE (R&D Systems). Posteriormente, se añadió 1 µL de anticuerpo frente a las diferentes integrinas; CD16 marcada con APC (Immunostep), frente CD14 APC

(Inmunostep), frente a CD3 APC (Inmunostep) y frente a CD41 CFTM Blue (Inmunostep).

Las muestras se incubaron durante 30 min, a TA y en oscuridad, con los anticuerpos correspondientes descritos anteriormente. Posteriormente se lisaron los eritrocitos con 200 µL de la solución comercial BD FACS LYSING SOLUTION a TA durante 15 minutos. A continuación, se analizaron en el citómetro BD FACSVersé (BD Beckman-Coulte) utilizando el software Flow Jo v.10. Se adquirieron 10.000 eventos, compensándose las muestras utilizando la herramienta del citómetro de compensación automatizada. Las diferentes poblaciones leucocitarias se identificaron por su tamaño (FS) y granularidad (SS) para poder determinar la media de la intensidad de fluorescencia en cada una de ellas, seleccionándose poblaciones de linfocitos unidos a plaquetas (CD3⁺ CD41⁺) y monocitos unidos a plaquetas (CD14⁺ CD41⁺) en muestras heparinizadas, y paralelamente en muestras con EDTA. En estas dos poblaciones leucocitarias se determinaron los niveles de CD186 (CXCR6), CXCR16 y CX₃CR1.

3.5 DETERMINACIÓN EN PLASMA DE QUIMIOCINAS CIRCULANTES

Para determinar los niveles de quimiocinas circulantes se recogió una muestra de 3 ml de sangre de cada paciente del estudio y se le añadió 100 UI de heparina/ml para promover la liberación de las quimiocinas unidas a los eritrocitos. Se dejó reposar la sangre con la heparina durante 10 minutos y por centrifugación se obtuvo el plasma. Las muestras de plasma obtenidas se guardaron en el congelador a – 80 °C hasta la cuantificación de las quimiocinas mediante la técnica de ELISA (*Enzyme like Immunosorbent Analysis*). Los resultados fueron expresados en concentración pM de la quimiocina.

En concreto, se midieron los niveles de P-selectina, PF-4/CXCL14, Endoglina/CD105, fractalquina/CX3CL1 y CXCL16. Para ello se utilizaron kits comerciales DUOSET de la casa comercial R&D y se siguieron las recomendaciones indicadas por el laboratorio comercial para cada quimiocina. Tras la incubación de las placas de 96 pocillos toda la noche con los anticuerpo primarios para las diferentes quimiocinas, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 3% BSA durante 1 h. Los sobrenadantes de las células y estándares para cada quimiocina fueron diluidos PBS/BSA 0,5% y añadidos a cada pocillo (100 μ L). La placa se incubó durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de incubación, se añadió el anticuerpo detector biotinilado para las diferentes quimiocinas durante 2h, seguido del enzima (NA/HRP, NeutrAvidin Horseradish Peroxidase Conjugated), y se dejó incubando durante 1h. Los lavados llevados a cabo entre las distintas incubaciones se realizaron en ciclos de 3 repeticiones con tampón de lavado (PBS/Tween 20 0,2 %). Por último, el sustrato (1-STEP ULTRA TMB-ELISA) fue añadido durante 30 min, transcurrida la hora de incubación con el enzima. Los valores de absorbancia se determinaron en un espectrofotómetro ($\lambda=450$ nm) y los datos fueron procesados mediante el software 'Prisma GraphPad'.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se analizaron mediante el programa informático *GraphPad Prism* (*Prism G. Graphpad software, EE.UU, 1994*) y se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (ESM). Se comprobó que no hubieran diferencias en edad entre grupos por medio del t-test y en cuanto a sexo por medio de χ^2 . Se realizó un ANCOVA

para la comparación de medias ajustadas para todos aquellos factores susceptibles de interferir con los resultados. Las diferencias entre los dos grupos experimentales fueron determinadas mediante el test de la *t de Student* utilizando el programa estadístico Stata 11.2 (Statistics/Data Analysis). La significación estadística es establecida a una $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1.- DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS EN LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

4.1.1 Características generales

Tal y como muestra la Tabla 3, no se observaron diferencias en los parámetros correspondientes a la edad, sexo, peso, índice de masa corporal (IMC) y circunferencia de cintura y de cadera.

	Controles N=23	Trombosis venosa N=22
Edad (años)	34 ± 7.84	37.5 ± 8.21
Sexo		
Mujeres	16 (69.57%)	16 (72.73%)
Hombres	7 (30.43%)	6 (27.27%)
IMC (kg/cm ²)	23.66 ± 3.49	25.41 ± 3.93
PA sistólica (mmHg)	106.6 ± 10.31	111.54 ± 10.7
PA diastólica (mmHg)	73.09 ± 7.0	70.18 ± 8.31
Cintura (cm)	80.73 ± 118.18	81.9 ± 14.08
Cadera (cm)	96.304 ± 12.0	98.36 ± 11.24

Tabla 3. Características generales de los pacientes con antecedentes de TVP y controles. Las variables cuantitativas se expresan como media ± ESM. Las variables cualitativas se expresan en valor absoluto (porcentaje). Índice de masa corporal (IMC); Presión arterial (PA).

Los pacientes con antecedentes de trombosis venosa presentaron los niveles de LDL colesterol superiores a los del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (pacientes; 133.27±20.84 vs controles; 115.13 ± 28.39 mg/dL; p<0,05). Respecto al resto de la analítica de los parámetros bioquímicos, no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros entre los grupos de estudio. Sin embargo, se observó una tendencia a un incremento en los valores de triglicéridos (pacientes; 114.13 ± 113.3 vs controles; 76.2 ± 44.86 mg/dL), microalbuminuria (pacientes; 27.74 ± 72.78 vs controles;

9.11 ± 9.64 mg/L), VSG (pacientes; 11.85 ± 10.6 vs controles; 9.13 ± 7.65 mm) y Dímero D (pacientes; 189.73 ± 164.75 vs controles; 172.73 ± 75.35 ng/mL) y menor para HDLc (pacientes; 55.5 ± 12.37 vs controles; 62.53 ± 8.83 mg/dL) en los sujetos con antecedentes de TVP respecto a los controles, aunque dichas diferencias no alcanzaron la significatividad estadística.

Para los valores de microalbuminuria y triglicéridos se realizó una transformación logarítmica comprobando la normalidad de la variable, observando posteriormente que no existían diferencias entre ambos grupos con o sin exclusión de *outliers*. Las diferencias observadas en la variable normal de microalbuminuria son debidas en los casos a dos valores extremos y en la variable normal de triglicéridos son debidas a dos valores extremos también.

En ambos grupos la determinación de trombofilia congénita fue negativa, así como el estudio de los anticuerpos antifosfolípido.

	Valores normales	Controles N=23	Trombosis venosa N=22
Glucosa	(64-106 mg/dL)	90.8 ± 11.24	93 ± 10.12
Urea	(20-50 mg/dL)	34 ± 8.41	30.59 ± 7.09
Creatinina	(0,51-0,95 mg/dL)	0.73 ± 0.13	0.76 ± 0.15
Ác.Úrico	(2,6-6 mg/dL)	4.83 ± 1.5	5.01 ± 1.49
Colesterol		187.4 ± 28.85	202 ± 28.5
HDL	(>35 mg/dL)	62.53 ± 8.83	55.5 ± 12.37
LDL	(<130 mg/dL)	115.13 ± 28.39	133.27 ± 20.84*
Triglicéridos	(40-160 mg/dL)	76.2 ± 44.86	114.13 ± 113.3
	(logaritmo)	4,2353	4,5029
Ferritina	(10-120 ng/mL)	63.6 ± 60.06	63.54 ± 68.42
Microalbuminuria	(0-30 mg/L)	9.11 ± 9.64	27.74 ± 72.78
	(logaritmo)	1,67217	1,67809
Leucocitos		6460 ± 1371.5	8185.9 ± 9815
Neutrófilos	(35-80%)	56.5 ± 9.03	59.2 ± 11.57
Linfocitos	(15-55%)	32.67 ± 7.87	29.06 ± 9.9
Monocitos	(2-8%)	5.83 ± 1.9	5.33 ± 1.97
Hemoglobina	(11,2-15,5 g/dL)	13.68 ± 0.83	13.64 ± 1.45
Plaquetas	(130-140 x10 ⁹ /L)	257066 ± 49467.8	221091 ± 36651.4
VSG	(1-20 mm)	9.13 ± 7.65	11.85 ± 10.6
TP	(8-13,8 seg.)	10.5 ± 0.74	10.7 ± 0.81
IQ	(75-110%)	99.2 ± 3.09	99.23 ± 2.48
TTPA	(seg.)	30.2 ± 2.06	29.87 ± 3.09
Fibrinógeno	(1,55-5,55 g/L)	3.45 ± 0.34	3.58 ± 0.46
Dimero D	(0-250 ng/mL)	172.73 ± 75.35	189.73 ± 164.75
HbA1c	(4-6,1 %)	5.30 ± 0.34	5.28 ± 0.24
Homocisteína	(5-15 µmol/L)	10.6 ± 5.8	9.95 ± 2.05
ANA	(0-1Ratio/cociente)	0.78 ± 1.0	0.94 ± 2.01
TSH	(0,27-4,2µU/mL)	2.51 ± 1.5	2.24 ± 1.23

Tabla 4. Valores de los parámetros bioquímicos en pacientes con antecedentes de TVP y controles. Lipoproteína de alta densidad (HDL); Lipoproteína de baja densidad (LDL); Velocidad de sedimentación globular (VSG); Tiempo de protrombina (TP); Índice de Quick (IQ); Anticuerpos antinucleares (ANA); Hormona estimuladora del tiroides (TSH). Las variables cuantitativas se expresan como la media ± ESM. Las variables cualitativas se expresan en valor absoluto (porcentaje). *p< 0,05 relativo a los valores de los controles.

En la determinación del grosor íntima-media de la arteria carótida por ecografía se observaron diferencias entre los pacientes con antecedentes de TVP y los controles. Como se puede observar en la Tabla 5, en la carótida derecha a nivel antero-lateral se detectó un grosor superior en los pacientes respecto a los controles (pacientes; 0.43 ± 0.07 mm vs

controles; 0.33 ± 0.03 mm; $p= 0,003$). De manera similar, la carótida izquierda de los pacientes a nivel antero-lateral presentó un mayor grosor (pacientes; 0.44 ± 0.08 mm vs controles; 0.36 ± 0.05 mm; $p= 0,03$) y también a nivel medio-lateral (pacientes; 0.42 ± 0.04 mm vs controles: 0.36 ± 0.05 mm; $p= 0,01$). En los parámetros que determinan la rigidez arterial (β , Ep, AC, AI, PWV) no se observaron diferencias entre ambos grupos. Al comparar los resultados de todas las mediciones de grosor de la íntima-media carotídea, tanto en carótida derecha como izquierda, las diferencias fueron significativas, siendo superiores en el grupo de pacientes (pacientes: 0.5 ± 0.07 mm vs controles: 0.42 ± 0.04 mm; $p=0.04$).

	Controles N=23	Trombosis venosa N=22
Carótida derecha		
Antero-lateral (mm)	0.33 ± 0.03	0.43 ± 0.07**
Medio-lateral (mm)	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.08
Postero-lateral (mm)	0.37 ± 0.06	0.46 ± 0.11
β	5.12 ± 1.45	5.21 ± 1.32
Ep	61.33 ± 20.21	64.25 ± 17.10
AC	1.2 ± 0.31	1.33 ± 0.31
AI	6.41 ± 6.58	14.86 ± 15.07
PWV	4.8 ± 0.80	4.97 ± 0.67
Carótida Izquierda		
Antero-lateral (mm)	0.36 ± 0.05	0.44 ± 0.08*
Medio-lateral (mm)	0.36 ± 0.05	0.42 ± 0.04**
Postero-lateral (mm)	0.37 ± 0.05	0.43 ± 0.08
β	5.95 ± 2.48	5.38 ± 1.19
Ep	71.22 ± 31.88	66.37 ± 16.56
AC	1.20 ± 0.35	1.16 ± 0.28
AI	8.78 ± 6.8	8.02 ± 13.72
PWV	5.13 ± 1.14	5.07 ± 0.61

Tabla 5. Valores del grosor de la íntima media carotídea derecha e izquierda por ecografía, a nivel antero-lateral, medio-lateral y postero-lateral, en pacientes con antecedentes de TVP y controles. Determinación de los parámetros de rigidez arterial por echo-tracking: módulo de elasticidad-deformación (Ep); parámetro de rigidez (β); *Compliance arterial* (AC); índice de aumento del pulso local (AI); Velocidad de onda de pulso local (PWV). Las variables cuantitativas se expresan como media ± ESM. * p< 0,05 **p<0,01 relativo a los valores de los controles.

4.2.- DETERMINACION DE LAS QUIMIOCINAS CIRCULANTES FRACTALQUINA (CX₃CL1), CXCL16, Y PF-4/CXCL4, P- SELECTINA Y ENDOGLINA/CD105

Tal y como se observa en la Figura 11, mediante la técnica de ELISA, se detectaron aumentos significativos en los niveles de fractalquina en el plasma de los pacientes con antecedentes de TVP comparado con los controles (pacientes; 10.10 ± 3.24 ng/mL vs controles; 4.61 ± 0.54ng/mL; p<0,05) (Figura 11).

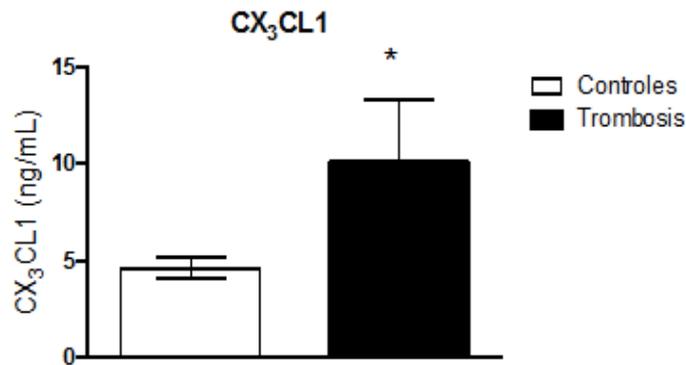


Figura 11. Niveles de la quimiocina fractalquina en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles. Los niveles circulantes se detectaron mediante la técnica de ELISA. Los resultados se muestran como las medias \pm ESM de n=22-23 experimentos. * $p < 0,05$ relativo a los valores del grupo control.

Con el fin de evaluar los niveles de CXCL16 circulantes, se determinaron los niveles plasmáticos mediante la técnica de ELISA. Tal y como se aprecia en la Figura 12, se detectaron aumentos significativos en el plasma de los pacientes con TVP con respecto a los controles (pacientes 1290 ± 195.7 pg/mL vs controles; 839.4 ± 108.5 pg/mL; $p = 0,04$).

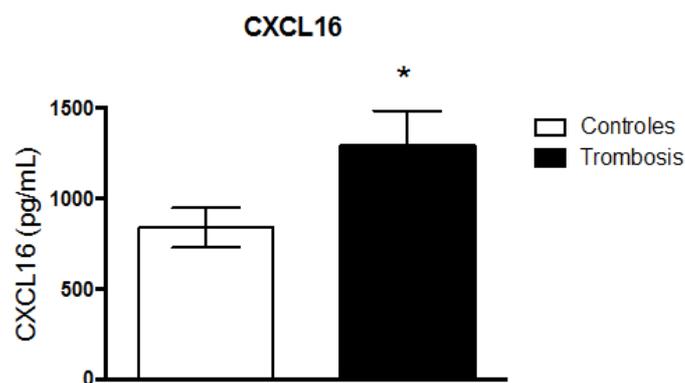


Figura 12. Niveles de la quimiocina CXCL16 en plasma de pacientes con TVP y controles. Los resultados se muestran como las medias \pm ESM de n=22-23 experimentos. * $p < 0,05$ relativo a los valores del grupo de pacientes con antecedente de trombosis.

La P-selectina es una glicoproteína expresada en la superficie del endotelio dañado así como en las plaquetas activadas, que se une a su receptor PSGL-1(130). En la Figura 13, se muestra como su análisis por ELISA detectó aumentos significativos en los niveles de P-selectina en los pacientes con antecedentes de TVP con respecto al grupo control (pacientes; $3348 \pm 161,8$ pg/mL vs controles; $2678 \pm 113,6$ pg/mL; $p=0,001$).

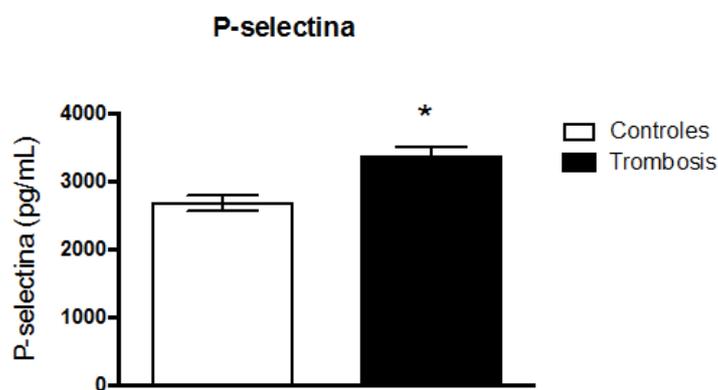


Figura 13. Niveles de P-selectina en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles. Los niveles plasmáticos de P-selectina se midieron por ELISA. Los resultados (pg/mL en el plasma) se muestran como las medias \pm ESM de $n=22-23$ experimentos. * $p<0.01$ relativo a los valores del grupo control.

El PF-4/CXCL4, al igual que la P-selectina, es una de las principales quimiocinas liberadas durante la activación plaquetaria e implicada en la infiltración leucocitaria (146, 147). En la Figura 14, se muestra como su análisis por ELISA detectó aumentos significativos en los pacientes con antecedentes de TVP con respecto al grupo control (pacientes; 517.9 ± 15.55 pg/mL vs controles; 458.8 ± 13.84 pg/mL; $p<0.05$).

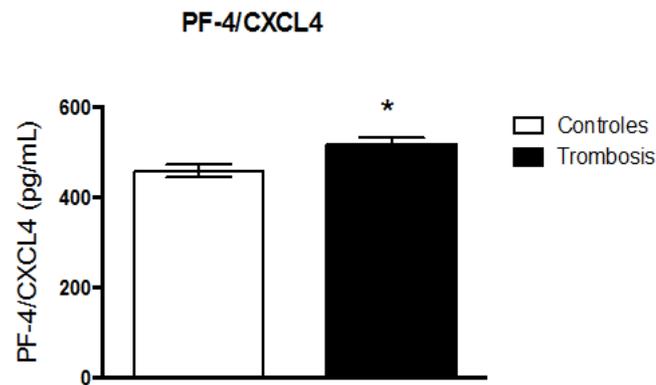


Figura 14. Niveles de PF-4/CXCL4 en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles. Los niveles plasmáticos de PF4/CXCL4 se midieron por ELISA. Los resultados (pg/mL en el plasma) se muestran como las medias \pm ESM de n=22-23 experimentos. * $p < 0,05$ relativo a los valores del grupo control.

La endoglina/CD105, es una glicoproteína de membrana tipo I expresada principalmente por las células endoteliales (207). En la Figura 15, se muestra como su análisis por ELISA detectó aumentos significativos en los pacientes con antecedentes de TVP con respecto al grupo control (pacientes; 3568 ± 159.6 pg/mL vs controles; 3181 ± 108.1 pg/mL; $p = 0,03$).

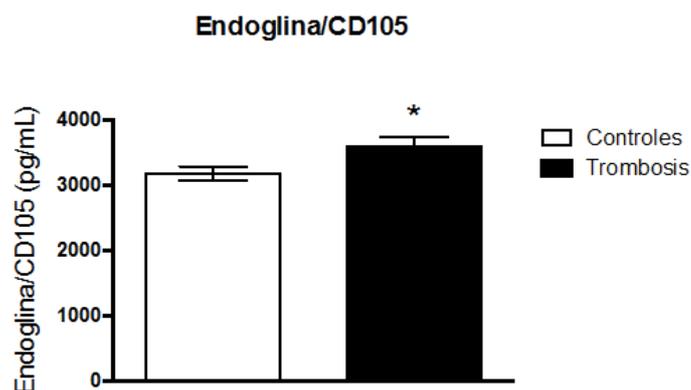


Figura 15. Niveles de Endoglina/CD105 en plasma de pacientes con antecedentes de TVP y controles. Los niveles plasmáticos de Endoglina/CD105 se midieron por ELISA. Los resultados (pg/mL en el plasma) se muestran como las medias \pm ESM de n=22-23 experimentos. * $p < 0.05$ relativo a los valores del grupo control.

4.3.- ESTUDIO DE LA ADHESIVIDAD LEUCOCITARIA AL ENDOTELIO VASCULAR

Con el fin de estudiar las interacciones leucocito-endotelio in vitro, iniciamos los estudios con la cámara de flujo. Para ello se perfundió sangre entera de los pacientes con antecedentes de TVP y de los controles sobre HUAEC y HUVEC que habían sido estimuladas previamente durante 4 horas con TNF α (20 ng/mL) a una presión de 1 dina/cm² durante 5 min.

En la Figura 16, se muestra como tras la estimulación con TNF α hay un aumento significativo en la adhesión leucocitaria en HUAEC y en HUVEC en ambos grupos ($p < 0,05$). Sin embargo, cabe destacar una mayor adhesividad de los leucocitos al territorio arterial con respecto al venoso en el grupo de pacientes (92.36 ± 20.256 vs 50.25 ± 9.571 células/mm², $p < 0,01$) (Figuras 16A -16B) comparado con los controles en respuesta a TNF α .

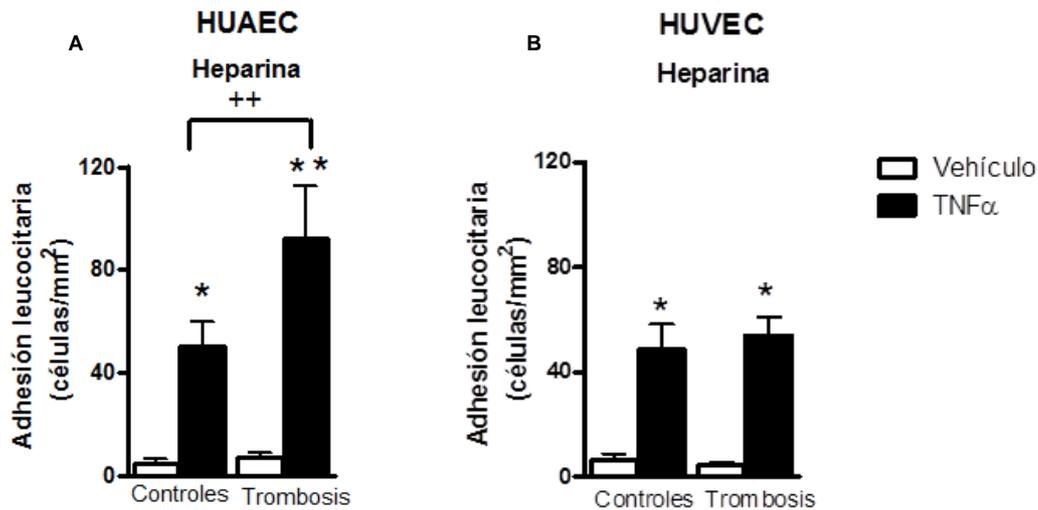


Figura 16. Acumulación leucocitaria en HUAEC y HUVEC estimuladas con TNF α mediante el empleo de sangre entera de pacientes con antecedentes de TVP y controles. (A) HUAEC y (B) HUVEC se estimularon con TNF α (20 ng/mL) durante 4 h. La sangre entera de los pacientes y controles se perfundió sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min a una presión de 1 dina/cm². Se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como las medias \pm ESM de n=22-23 experimentos. *p<0,05 relativo a los valores del vehículo++ p<0.01 relativo a los valores del grupo estimulado con TNF α en los controles.

4.4.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FRACTALQUINA EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR

Estudios previos han demostrado que TNF α induce la expresión en el endotelio vascular de la fractalquina (208). Además, se ha observado que dicha quimiocina participa en el reclutamiento de los leucocitos en el endotelio vascular en diferentes patologías cardiovasculares tales como la EPOC (209) y coronariopatías (210). Por ello, con el fin de evaluar el papel funcional de fractalquina en la interacción leucocito-endotelio en pacientes con antecedentes de TVP, 10 minutos antes de realizar el experimento, algunas placas estimuladas con TNF α (20 ng/mL) se incubaron con un anticuerpo neutralizante frente a fractalquina o con un

anticuerpo irrelevante control (MOPC-21). En la Figura 17, se muestra como el bloqueo de la función de la fractalquina disminuyó de forma significativa la adhesión leucocitaria inducida por $TNF\alpha$ en HUAEC en un 49 % en los pacientes (Figura 17A), mientras que en el grupo control no produjo ningún efecto. Por otro lado, la neutralización de la fractalquina en HUVEC no afectó significativamente la adhesión leucocitaria en ningún grupo de estudio (Figura 17B).

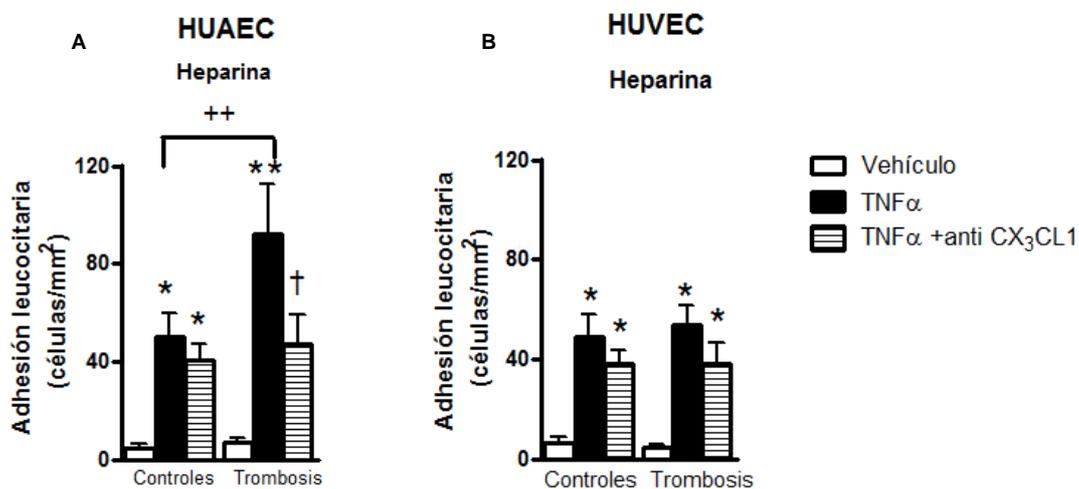


Figura 17. Efecto de un anticuerpo neutralizante de fractalquina sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC inducida por $TNF\alpha$. (A) HUAEC y (B) HUVEC se estimularon con $TNF\alpha$ (20 ng/mL) durante 4 h. Algunas células se pretrataron con un anticuerpo frente a fractalquina 10 min antes de la perfusión de la sangre. La sangre entera de los pacientes y controles se perfundió sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min a una presión de 1 dina/cm², y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n= 22-23 experimentos. * $p < 0,05$ relativo a los valores del vehículo. ++ $p < 0,01$ relativo a los valores del grupo estimulado con $TNF\alpha$ en los controles. † $p < 0,05$ relativo a los valores del grupo estimulado con $TNF\alpha$ en pacientes.

Se investigó en las células mononucleares circulantes la expresión del receptor de fractalquina CX₃CR1. Sorprendentemente, en la población

de monocitos se detectó un aumento significativo en la expresión del receptor CX₃CR1 en los pacientes respecto a los controles, que se evidenció en la intensidad media de fluorescencia (pacientes; 685.2 ± 37.05 vs controles; 847 ± 62.4; p<0,05). Sin embargo, tras tratar las muestras con EDTA y provocar la disociación de plaquetas a los monocitos, no se observaron diferencias en la expresión de CX₃CR1 entre ambos grupos (pacientes; 415.7 ± 23.35 vs controles; 429.7 ± 18.8; p= 0,64) (Figura 18).

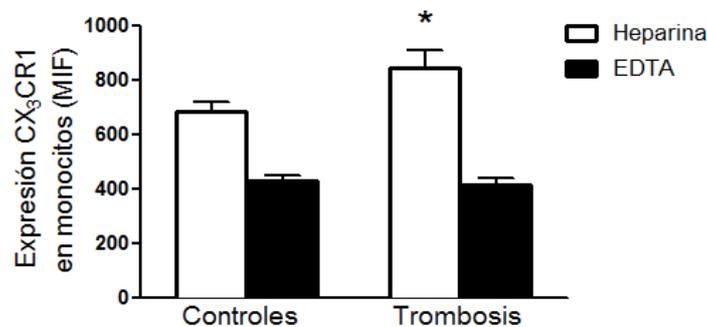


Figura 18. Expresión de CX₃CR1 en monocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo. El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CX₃CR1 en monocitos humanos. Se representa el valor medio ± ESM de n=22-23 experimentos. *p<0,05 relativo a los valores en controles.

La expresión del receptor de fractalquina CX₃CR1 en la población linfocitaria en sangre heparinizada fue similar en ambos grupos (pacientes 754.6 ± 98.72 vs controles; 655 ± 48.31; p= 0,34). Además, la expresión de CX₃CR1 en linfocitos fue similar en ambos grupos cuando se incubó con EDTA (pacientes; 359.6 ± 44.47 vs controles; 318.7 ± 9.83; p= 0,342) (Figura 19).

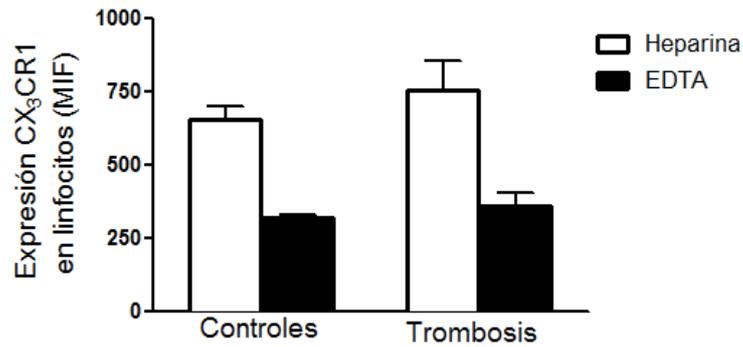


Figura 19. Expresión de CX₃CR1 en linfocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo. El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CX₃CR1 linfocitos humanos. Se representa el valor medio \pm ESM de n=22-23 experimentos. *p<0,05 relativo a los valores en controles.

Por otro lado, mediante análisis por citometría de flujo en sangre heparinizada se detectó un ligero aumento en la expresión del receptor de fractalquina (CX₃CR1) en las plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP respecto al grupo control sin alcanzar la significatividad estadística (pacientes; 344.7 ± 71.13 vs controles; 304.3 ± 41.73 ; p>0,05) (Figura 20).

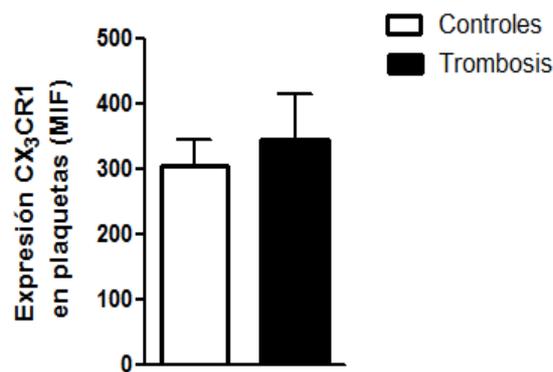


Figura 20. Expresión de CX₃CR1 en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo. El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CX₃CR1 en plaquetas humanas. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n= 22-23 experimentos.

4.5.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR

Las plaquetas participan en la adhesión y reclutamiento de leucocitos al endotelio en diferentes patologías cardiovasculares (211). En nuestro estudio, el siguiente objetivo fue investigar la posible implicación de las plaquetas en la interacción leucocito-endotelio en los pacientes con antecedentes de TVP. Mediante el sistema de la cámara de flujo, se hizo pasar la sangre de pacientes o controles, pero en este caso había sido tratada con EDTA -ver metodología apartado 3.3.3- sobre las placas de HUAEC y HUVEC que habían sido estimuladas previamente durante 4 h con TNF α (el EDTA disocia la unión de plaquetas a leucocitos). En estas condiciones experimentales, en los pacientes se pudo detectar que el pretratamiento de la sangre con EDTA disminuyó drásticamente la adhesión leucocitaria al endotelio arterial (71,38% de inhibición) (Figura 21A), comparado con la sangre no tratada (Figura 16 A), mientras que en los controles apenas se vio afectada. Por otro lado, en el endotelio venoso (HUVEC) no se observaron diferencias (Figura 21B).

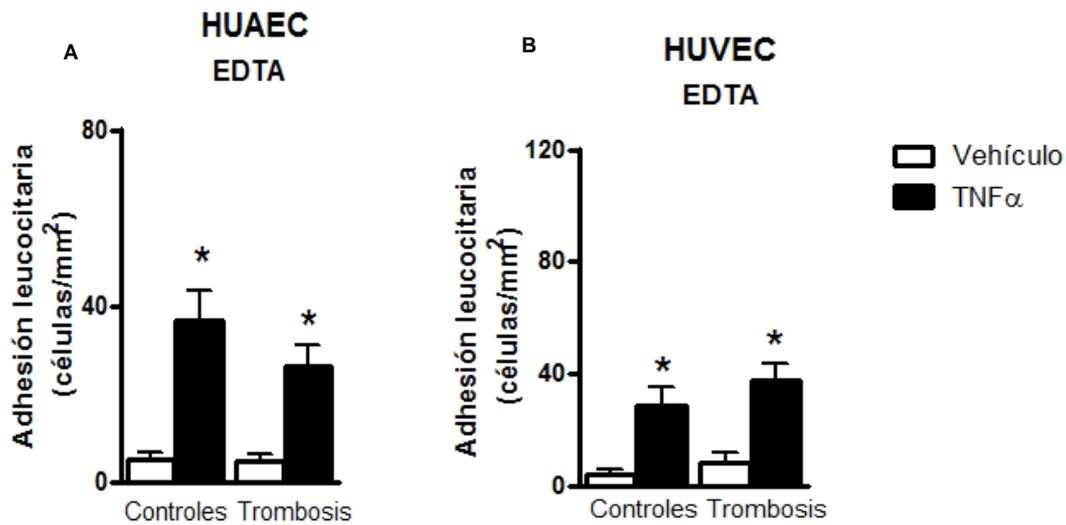


Figura 21. Efecto de la disociación de la unión de plaquetas a leucocitos sobre la adhesión de leucocitaria en HUAEC y HUVEC inducida por TNF α en pacientes con antecedentes de TVP y controles. (A) HUAEC y (B) HUVEC se estimularon con TNF α (20 ng/mL) durante 4 h. Parte de la sangre de los pacientes y controles fue pretratada con EDTA (10 mM) y posteriormente se perfundió sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min. a una presión de 1 dina/cm², y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n=22-23 experimentos. *p<0,05 relativo a los valores del vehículo.

A continuación, se analizaron las plaquetas con el fin de investigar el grado de activación plaquetaria en la sangre de los pacientes jóvenes con antecedentes de TVP mediante citometría de flujo. Tal y como se muestra la Figura 22, aunque no se alcanzó la significatividad estadística, se detectó una clara tendencia al aumento de la expresión por las plaquetas, del marcador PAC-1 (pacientes; 192.2 ± 43.7 vs controles; 128.2 ± 32.29 ; p= 0,102) (Figura 22A), así como de P-selectina (CD62P) en pacientes con respecto al grupo control (pacientes; 174.2 ± 59.2 vs controles; 71.80 ± 13.94 ; p=0,1194) (Figura 22B).

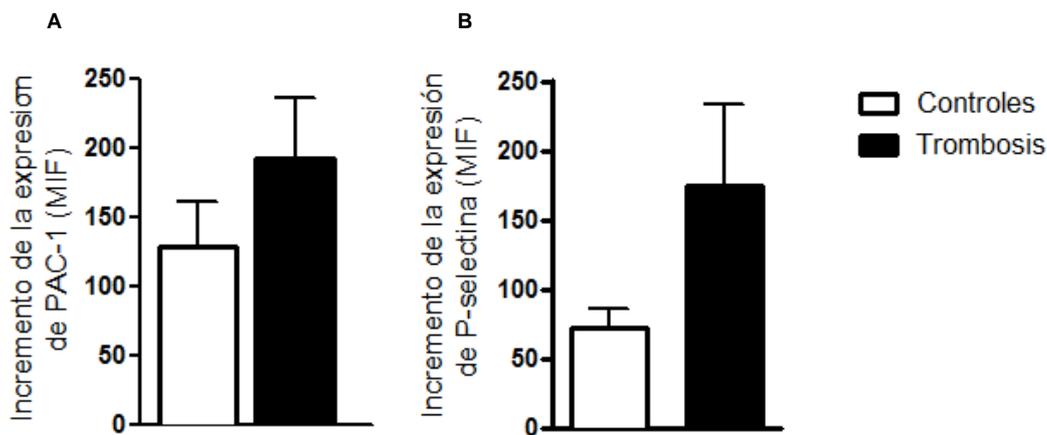


Figura 22. Incremento de la expresión de PAC-1 y de P-selectina en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de $n= 22-23$ experimentos para PAC-1 (A) y P-selectina (CD62) (B).

4.6.- ESTUDIO DEL PAPEL DE CXCL16 EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR

Al igual que fractalquina, CXCL16 parece tener un papel dual como molécula de adhesión y factor quimiotáctico de leucocitos (172). Además, estudios recientes han demostrado que esta quimiocina está implicada en la infiltración leucocitaria en diferentes enfermedades cardiovasculares (212). Sin embargo, su papel en la trombosis venosa no ha sido investigado hasta el momento. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar el posible papel funcional de CXCL16 en pacientes con antecedente trombótico llevando a cabo una aproximación experimental similar a la realizada anteriormente con la fractalquina.

Mediante los estudios con la cámara de flujo, y con el fin de evaluar el papel de CXCL16 en la interacción leucocito-endotelio en los pacientes, 10 minutos antes de realizar el experimento, algunas placas estimuladas con TNF α (20 ng/mL), se incubaron con un anticuerpo frente a CXCL16

y/o control (anticuerpo MOPC-21). En la Figura 23, se muestra como la estimulación con $TNF\alpha$ induce en ambos territorios un aumento significativo en la adhesión leucocitaria ($p < 0,05$), observándose de nuevo un mayor aumento en dichas interacciones en HUAEC en el grupo de pacientes. En estos pacientes, el bloqueo de la función de CXCL16 no disminuyó de manera significativa la adhesión leucocitaria inducida por $TNF\alpha$ a nivel del territorio arterial (Figura 23A, $p > 0,05$). La neutralización de CXCL16 en HUVEC tampoco afectó de forma significativa la adhesión leucocitaria en pacientes con TVP (Figura 23B, $p > 0,05$).

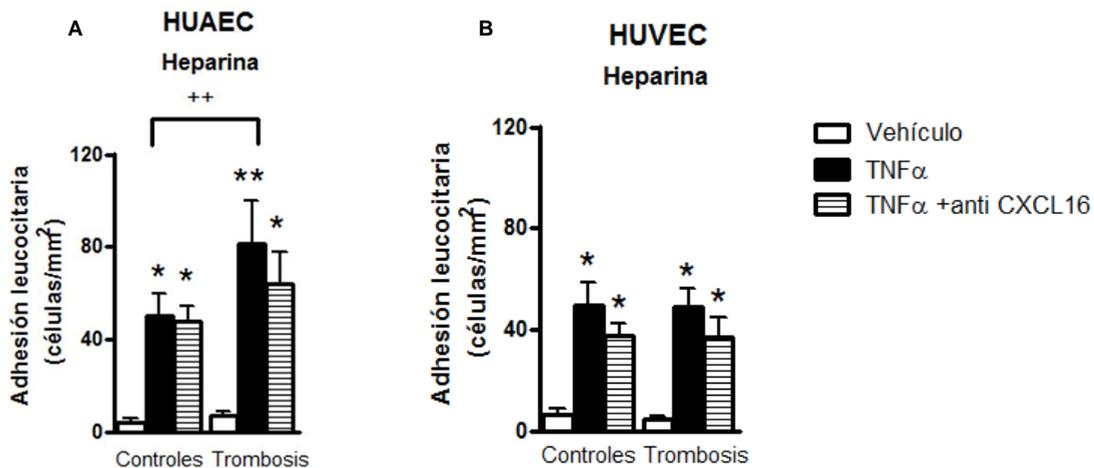


Figura 23. Efecto de un anticuerpo neutralizante de CXCL16 sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC inducida por $TNF\alpha$.

(A) HUAEC y (B) HUVEC se estimularon con $TNF\alpha$ (20 ng/mL) durante 4 h. Algunas células se pretrataron con un anticuerpo frente a CXCL16 10 min antes de la perfusión de la sangre. La sangre entera de los pacientes y controles se perfundió sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm², y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n=22-23 experimentos. * $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ relativo a los valores de vehículo.

El análisis por citometría de flujo de la población plaquetaria en sangre heparinizada, no detectó diferencias en la expresión de CXCL16 en los

individuos con antecedentes de TVP con respecto a los controles (pacientes; 99.29 ± 21.33 vs controles; $99,33 \pm 17,41$; $p= 0,99$) (Figura 24A). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de CXCR6 entre pacientes respecto al grupo control (pacientes; 115.4 ± 20.13 vs controles; 91.65 ± 8.46 ; $p= 0,25$) (Figura 24B).

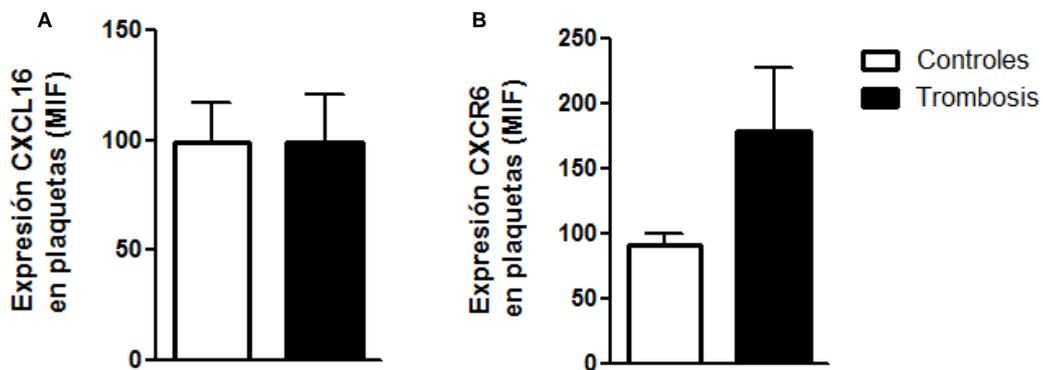


Figura 24. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en plaquetas de pacientes con antecedentes de TVP y controles por citometría de flujo. El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CXCL16 (A) y CXCR6 (B). Se representa el valor medio \pm ESM de $n=22-23$ experimentos.

Al realizar los estudios con cámara de flujo, de nuevo se observa que al pretratar la sangre con EDTA las interacciones inducidas por $TNF\alpha$ eran revertidas o disminuidas en HUAEC y HUVEC, y de manera más marcada en el grupo de pacientes con antecedentes de TVP con respecto al grupo control (Figura 25). Hay que destacar que cuando las células fueron incubadas con un anticuerpo neutralizante de la función de CXCL16 se observó una tendencia a la disminución en las interacciones leucocito-endotelio inducidas por $TNF\alpha$ en HUAEC (Figura 25A) y HUVEC (Figura 25B), sin embargo no se alcanzó la significatividad estadística en ningún grupo de estudio ($p>0,05$).

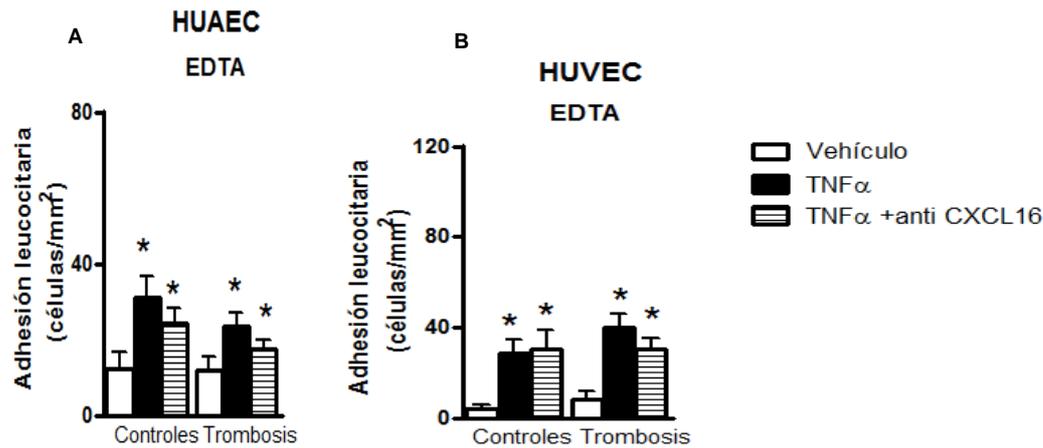


Figura 25. Efecto de la disociación de la unión de plaquetas a leucocitos sobre la adhesión de leucocitaria en HUAEC y HUVEC inducida por TNF α y tras la neutralización de CXCL16. (A) HUAEC y (B) HUVEC se estimularon con TNF α (20 ng/mL) durante 4 h. Algunas células se pretrataron con un anticuerpo frente a CXCL16 10 min antes de la perfusión de la sangre. Parte de la sangre de los pacientes y controles fue pretratada con EDTA (10mM) y posteriormente se perfundió sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm², y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n=22-23 experimentos. *p<0,05 relativo a los valores del vehículo.

El análisis por citometría de flujo de la población monocítica circulante no detectó diferencias significativas en la expresión CXCL16 entre los dos grupos en sangre heparinizada, si bien se observó un leve aumento en los pacientes aunque estadísticamente no fue significativo (pacientes; 1839 \pm 131.8 vs controles; 1699 \pm 119.7; p= 0,435). Tras el tratamiento de las muestras con EDTA, la expresión disminuyó en ambos grupos (pacientes; 1457 \pm 181.9 vs controles; 1182 \pm 69.87; p= 0,15) (Figura 26A).

En sangre heparinizada, la expresión de CXCR6 en monocitos fue similar en pacientes y controles (pacientes; 912 \pm 89.08 vs controles; 766.8 \pm 78.43; p= 0,225). Tras el tratamiento con EDTA no se

observaron diferencias en la expresión de CXCR6 entre ambos grupos (Figura 26B).

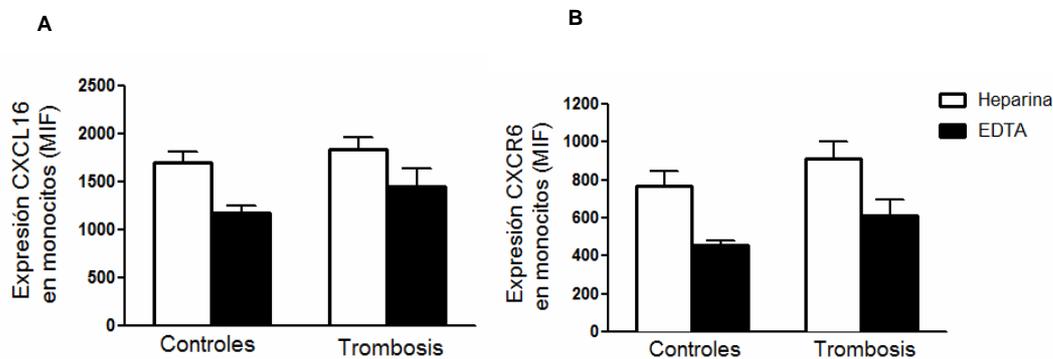


Figura 26. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en monocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizados por citometría de flujo. El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) CXCL16 (A) y CXCR6 (B) Se representa el valor medio \pm ESM de n=22-23 experimentos.

El análisis por citometría de flujo de la población linfocitaria, en este caso no detectó diferencias en la expresión CXCL16 entre los individuos con antecedentes de TVP con respecto a los controles sanos en sangre heparinizada (pacientes; 619.9 ± 66.82 vs controles; 539.7 ± 61.52 , $p=0.43$) (Figura 27A). No se observaron tampoco diferencias en la expresión de CXCR6 en los linfocitos entre ambos grupos (pacientes; 475.8 ± 58.50 vs controles; 477.5 ± 59.8 , $p=0.98$) (Figura 27B).

Al tratar las muestras con EDTA, hay una disminución más drástica en la expresión tanto de CXCL16 (pacientes; 211.9 ± 37.52 vs controles; 186.6 ± 18.03 $p=0.528$) (Figura 27A) como de su receptor CXCR6 (pacientes; 224.4 ± 54.96 vs controles; 192.9 ± 27.51 , $p=0.586$) (Figura 27B) para ambos grupos.

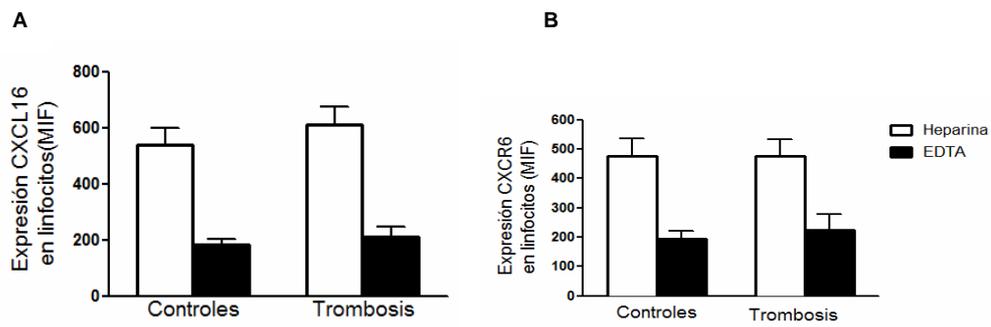


Figura 27. Expresión de CXCL16 y CXCR6 en linfocitos de pacientes con antecedentes de TVP y controles analizado por citometría de flujo El gráfico representa los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CXCL16 (A) y CXCR6 (B). Se representa el valor medio \pm ESM de n=22-23 experimentos.

5. DISCUSIÓN

La enfermedad tromboembólica venosa es la patología vascular más frecuente en gente joven, con 70 casos por cada 100.000 habitantes/año (3). En los últimos años se ha visto asociada al desarrollo de patología arterial, lo que aumenta aún más su morbimortalidad con una amplia repercusión socioeconómica (2). Este hecho ha sido objeto de diferentes estudios, sin que los mecanismos por los cuales se produce esta asociación entre patología venosa y arterial hayan sido del todo elucidados, sugiriéndose una etiopatogenia común principalmente basada en el estado inflamatorio que subyace en ambas patologías. Por ello, el objetivo del presente trabajo lo ha constituido el estudio de la inflamación vascular asociada a la trombosis venosa, centrándonos en diferentes mecanismos que hasta la fecha no han sido investigados; el papel de las quimiocinas fractalquina/CX₃CL1, CXCL16 y la posible implicación de las plaquetas.

Para llevar a cabo el presente trabajo de Tesis doctoral se han seleccionado pacientes jóvenes que hubieran presentado un episodio de trombosis venosa profunda en los últimos cinco años y que además, no estuvieran bajo terapia anticoagulante ni antiagregante en el momento del estudio o en un periodo previo de seis meses. Esta selección de pacientes es novedosa en cuanto a la relación arterio-venosa, ya que en los estudios publicados siempre se han valorado pacientes de mayor edad y con factores de riesgo arteriales. Así mismo, la causa de la trombosis debía ser idiopática, para evitar la repercusión de comorbilidades y otros factores secundarios en la reactividad endotelial. Por lo tanto, se excluyeron aquellos pacientes que presentaban trombofilia congénita y/o anticuerpos antifosfolípido positivos, enfermedades malignas, mujeres embarazadas, mujeres con tratamiento anovulatorio, o bien sujetos

obesos. Paralelamente, se ha estudiado un grupo control de voluntarios sanos con en el mismo rango de edad y género que los pacientes.

En primer lugar, con el fin de determinar el grado de afectación arterial subclínica, a los sujetos del estudio se les realizó una ecografía carotídea. La ecografía carotídea (determinación del grosor íntima-media carotídea mayor de 0,8 mm e identificación de placas de ateroma) es una técnica validada para evaluar la aterosclerosis sistémica, donde los hallazgos asociados a un aumento de grosor de la íntima-media carotídea se correlacionan con aterosclerosis coronaria valorada por angiografía y por ecografía intravascular (213). Es por tanto, una técnica que nos aporta amplia información del daño arterial precoz en estos pacientes jóvenes.

Se han determinado los niveles plasmáticos de nuevos marcadores de inflamación asociados al proceso de disfunción endotelial en estos pacientes, con el fin de conocer si existe un estado proinflamatorio en ellos y un mayor riesgo asociado de sufrir eventos cardiovasculares. En el presente estudio, nos hemos centrado principalmente en dos quimiocinas que participan y tienen un papel esencial en el proceso de reclutamiento e infiltración leucocitaria en el endotelio vascular, la fractalquina/CX₃CL1 y CXCL16. Estos marcadores, han sido objeto de estudio en diferentes patologías cardiovasculares en investigaciones previas, sin embargo, hasta la fecha no han sido investigados en la trombosis venosa idiopática en pacientes jóvenes. Ambas quimiocinas presentan características semejantes ya que tienen un papel dual actuando como quimioatrayentes y moléculas de adhesión de células que expresan su receptor, CX₃CR1 y CXCR6 respectivamente. La quimiocina *fractalquina*, ha demostrado desempeñar un papel importante en el proceso de aterosclerosis y fisiopatología cardiovascular (170, 172). Del

mismo modo, la quimiocina *CXCL16* actúa también como receptor de lipoproteínas de baja densidad (214), por lo que algunos estudios la describen como un posible marcador asociado a la inflamación y a la progresión de la aterosclerosis coronaria (179, 212). Por otro lado, teniendo en cuenta el importante papel que ejercen las plaquetas en la respuesta inflamatoria, se han medido dos moléculas liberadas durante su activación, la P-selectina y el factor plaquetar-4 (PF-4/CXCL4) (215). La *P-selectina* es una molécula de adhesión celular expuesta en la superficie del endotelio y de las plaquetas activadas, que se une a su ligando PSGL-1 (*P-selectinglycoprotein ligand-1*) (216, 217), a través del cual, tienen lugar las interacciones leucocito-plaqueta durante la inflamación. Ejerce un papel importante durante la aterogénesis, donde el reclutamiento leucocitario en el trombo arterial es dependiente de la expresión de P-selectina por la plaqueta (218). El *PF-4/CXCL4* además de desempeñar una función quimiotáctica sobre los leucocitos, es capaz de inducir la diferenciación de monocitos a macrófagos debido a su capacidad para captar lipoproteínas favoreciendo así la aterogénesis (146, 147). Esta quimiocina induce un fenotipo de macrófago denominado “M4” los cuales se han visto asociados recientemente a la presencia de placas de ateroma inestables (219). También se han analizado los niveles circulantes de *endoglina/CD105*, que es expresada principalmente en la superficie de las células endoteliales de la vasculatura. Esta implicada en procesos tales como la angiogénesis y remodelación vascular (220, 221), además de ser capaz de regular la infiltración leucocitaria durante la respuesta inflamatoria (222).

Tras determinar los niveles de los diferentes marcadores de inflamación, se han realizado estudios funcionales mediante el empleo de la cámara de flujo o “flow chamber” *in vitro*. Esta técnica presenta la

ventaja de que nos permite visualizar la adhesión de las células sanguíneas al endotelio vascular bajo condiciones dinámicas de flujo. Además, se pueden cuantificar estos eventos al poder procesar las imágenes detenidamente. En estos estudio se hace pasar la sangre de los sujetos sobre una monocapa de células endoteliales que han sido estimuladas previamente con un factor proinflamatorio, en este caso TNF α , permitiéndonos evaluar las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales humanas y por tanto, el grado de respuesta inflamatoria. Otra ventaja de esta técnica es que nos permite mimetizar las condiciones dinámicas de flujo fisiológicas, de hecho, las condiciones de flujo empleadas durante el experimento (1 dina/cm²) se asemejan en mayor medida al flujo arterial enlentecido que se da en ramificaciones y curvaturas donde tienen lugar los procesos de adhesión leucocitaria y por consiguiente, existe mayor predisposición al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. También nos permite estudiar la implicación de las plaquetas y mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, estudiar los mecanismos por los cuales ocurren estas interacciones. Para analizar la expresión de los diferentes marcadores de inflamación en las plaquetas y en las diferentes subpoblaciones leucocitarias, se ha utilizado la citometría de flujo, investigando, por tanto, la implicación de los diferentes elementos celulares en la respuesta inflamatoria (223). Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, así como la posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula.

En el estudio comparativo de las características antropométricas de los pacientes y los controles, se observó que a pesar de ser sujetos con edades similares y sin comorbilidades ni factores de riesgo conocidos, los pacientes con antecedente trombótico presentan un discreto aumento del peso, IMC, circunferencia de cintura y cadera y presión arterial. Aunque estos resultados no alcanzaron la significatividad estadística, sí que indican una tendencia al desarrollo de factores de riesgo cardiovascular clásicos como ya se ha demostrado en anteriores trabajos, donde se han relacionado con la presencia de enfermedad tromboembólica venosa (46). Esta asociación entre ambas patologías ha quedado manifiesta en diferentes estudios que demuestran una mayor prevalencia de aterosclerosis subclínica en pacientes con trombosis venosa (75, 79, 224, 225). Prandoni y col. en el año 2003, fueron los primeros en observar esta asociación al realizar en una cohorte de 299 pacientes con diagnóstico de TVP y 150 controles una ecografía carotídea que mostraba la presencia de placas de ateroma en más de 112 pacientes frente a 48 en el grupo control. Además, dentro del grupo de pacientes el número de placas era superior cuando las trombosis eran de origen idiopático. Jezovnik y col. años más tarde (2010), y con un número menor de pacientes, 47 frente a 44 controles, observan de nuevo un mayor grosor de la íntima-media carotídea en los pacientes con antecedente trombótico, lo que coincide con nuestras observaciones. Recientemente, todos estos estudios han sido corroborados por Milan y col. (2014), concluyendo de nuevo una fuerte asociación entre ambas patologías, principalmente para las trombosis de origen idiopático. Así también, se han detectado más calcificaciones a nivel de las arterias coronarias (51) y afectación arterial periférica (80) en estos pacientes. Sin embargo, cabe destacar, que estos trabajos caso-control realizados hasta

la fecha incluyen pacientes de mayor edad no exentos de factores de riesgo cardiovascular, lo que justificaría, en parte, la presencia de un mayor grosor de la íntima-media carotídea observado, así como de placas de ateroma (79). Por tanto, en el presente estudio por primera vez se demuestra que los sujetos con antecedentes de TVP idiopática presentan un mayor grosor de la íntima-media carotídea, aunque éste no llegue a ser significativa de aterosclerosis subclínica.

Estas diferencias observadas a nivel carotídeo podrían estar relacionadas con el leve aumento en el perfil lipídico observado en los pacientes, principalmente relacionado con los niveles de LDL, significativamente superiores en los pacientes con respecto a los controles. Los resultados obtenidos en nuestro estudio podrían estar en línea con investigaciones previas, donde se ha demostrado la presencia de dislipemia con el desarrollo de trombosis idiopática (65, 66, 226), demostrándose un aumento en los niveles de LDL (227). En este sentido, en un estudio retrospectivo descriptivo realizado en 313 pacientes con historia de enfermedad tromboembólica, los niveles elevados de LDL (> 180 mg/dL) se asociaban a una mayor recurrencia de trombosis y así mismo, a un mayor desarrollo de síndrome posttrombótico y de patología arterioesclerótica (228). Por lo tanto, estos hallazgos nos indican que podría existir una afectación arterial temprana la cual puede predisponer al desarrollo de eventos cardiovasculares en los pacientes jóvenes con antecedentes de TVP.

Otro hallazgo importante en este estudio fue el incremento de los niveles plasmáticos de la quimiocina *fractalquina*/ *CX₃CL1* así como de su receptor *CX₃CR1* en los pacientes con antecedentes de TVP idiopática. Este aumento en los niveles de fractalquina también ha sido observado en otras enfermedades que comparten disfunción endotelial e

inflamación vascular tales como la esclerosis sistémica (229), coronariopatías (210, 230, 231), enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide, y las vasculitis sistémicas (232-234). Además, en las enfermedades coronarias los niveles plasmáticos de fractalquina se han relacionado con un peor pronóstico (230), siendo para algunos autores un marcador de vulnerabilidad de rotura de la placa aterosclerótica (235). Otros trabajos han demostrado que la mutación en el receptor de la fractalquina (CX₃CR1-M280), se traduce en un defecto de adhesión y actividad quimiotáctica (236, 237). A partir de nuestros resultados, el incremento del eje fractalquina/CX₃CR1 que observamos podría indicar un cierto grado de inflamación sistémica y relacionarse con el mayor desarrollo de eventos cardiovasculares en los pacientes con antecedentes de TVP. Esta asociación plausible la corroboramos al analizar otros parámetros de activación leucocitaria, plaquetaria y endotelial.

De manera similar, los niveles de *CXCL16* están elevados en los pacientes con antecedentes de trombosis venosa profunda. Esta quimiocina se ha detectado en las placas ateroscleróticas (177-180, 238) y en el plasma de pacientes con patologías coronarias, con un peor pronóstico de la enfermedad (239, 240). Además, en otras enfermedades sistémicas con base inflamatoria tales como el lupus eritematoso sistémico, elevadas concentraciones plasmáticas de *CXCL16* se han relacionado con la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones cardiovasculares (241).

La *P-selectina* soluble se ha propuesto no solo como un marcador de inflamación o activación plaquetaria, sino como un inductor directo de la actividad procoagulante asociada con la enfermedad vascular y trombótica (242). Se encuentra elevada en diferentes patologías

cardiovasculares (243-245), demostrándose en modelos animales que participa en la formación y desarrollo de la placa aterosclerótica (201, 246). En estudios previos se han detectado niveles elevados de P-selectina en pacientes con antecedentes de trombosis venosa (247-253). En dichos trabajos, la P-selectina era medida tras el episodio agudo de trombosis, en cambio en el presente estudio se detecta elevada incluso años después, lo cual corrobora el estado inflamatorio que presentan estos pacientes. Cabe destacar, que elevados niveles de P-selectina soluble se han relacionado con la recurrencia de trombosis (254, 255) y con una mayor presencia de eventos trombóticos en pacientes con cáncer (255, 256).

El *PF-4/CXCL4* es una quimiocina que se libera de forma abundante tras la activación plaquetaria desde los gránulos α , al igual que la P-selectina (215), contribuyendo a la atracción de monocitos al foco inflamatorio. Se han descrito niveles elevados en placas ateroscleróticas (257) y en plasma de pacientes con infarto agudo de miocardio (258). Teniendo en cuenta el papel aterogénico de PF4/CXCL4, y que sus niveles están aumentados en los pacientes con antecedentes de TVP, dicha quimiocinas podría establecerse como un posible marcador de riesgo cardiovascular asociado a estos pacientes.

La *endoglina/CD105* se expresa principalmente en la superficie de células endoteliales que integran la vasculatura, siendo considerada un marcador de disfunción endotelial (160). En nuestro estudio se detectan niveles elevados de endoglina en los pacientes con antecedentes de TVP respecto a los controles. Estudios previos también han demostrado que dicho marcador está elevado en patologías tales como la aterosclerosis (259), la pre-eclampsia (260), dislipemias (261), diabetes mellitus o en la hipertensión (262).

La disfunción endotelial es la que conduce a un fenotipo proinflamatorio y protrombótico que conlleva a la adhesión y posterior migración leucocitaria (263), con el consiguiente aumento de las diferentes quimiocinas involucradas durante la respuesta inflamatoria. Estos eventos están directamente relacionados con el inicio de la formación de lesiones ateroscleróticas y el desarrollo de la trombosis venosa (101, 102). Por tanto, con el fin de analizar el comportamiento de los leucocitos humanos de paciente con antecedentes de TVP, se utilizó un modelo de flujo dinámico *in vitro* que nos permitió estudiar las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales estimuladas o no con TNF α . Sorprendentemente, al perfundir la sangre a través de la monocapa de células endoteliales se detectaron diferencias marcadas y significativas en la adhesión leucocitaria entre ambos grupos. De hecho, se observó una mayor adhesión en los pacientes con respecto a los controles, por tanto, una mayor respuesta inflamatoria. Además, hay que destacar que esta adhesividad fue significativamente mayor en el territorio arterial que en el venoso. Este hallazgo es relevante si tenemos en cuenta que son pacientes que han presentado una patología venosa y no arterial. Quizá una explicación plausible sea el hecho de que en el desarrollo de la trombosis venosa se necesita la suma de varios factores para poner en marcha el proceso de coagulación.

El TNF α es una citoquina que a través de la activación del factor transcripcional NF-kB, aumenta la expresión de fractalquina en células endoteliales (172, 264-267). Estudios recientes han demostrado que su silenciamiento a nivel arterial se asocia a una disminución en la expresión de fractalquina y en las interacciones leucocito-endotelio (209). En los pacientes con antecedentes de TVP se demuestra que la fractalquina desempeña un papel relevante, ya que al neutralizar su

acción mediante un anticuerpo monoclonal, la adhesión de leucocitos al endotelio arterial disminuye de manera considerable (~ 49% inhibición), mientras que la adhesión al endotelio venoso no se ve afectada. Estas observaciones sugieren por tanto, que la fractalquina parece participar más activamente en la inflamación arterial que en la venosa inducida por la exposición a TNF α en estos pacientes, lo que podría explicarse, en parte, por la mayor expresión de esta quimiocina en este territorio (265, 268). Nuestros resultados además, están en concordancia con varios estudios recientes realizados por nuestro grupo en los que se ha demostrado el papel relevante de la fractalquina en la acumulación selectiva de leucocitos mononucleares en las arteriolas inducida por el péptido del sistema renina angiotensina (SRA), angiotensina II (268). Además, en otro estudio se observó que la fractalquina media la adhesión selectiva de leucocitos mononucleares al endotelio arterial en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (209). A nivel venoso, en cambio, suponemos la fractalquina actuaría en combinación con otros mediadores inflamatorios.

La quimiocina CXCL16, al igual que fractalquina, tiene un papel dual como molécula de adhesión y factor quimiotáctico de leucocitos que expresan su receptor CXCR6 (172,181) e igualmente, su expresión es inducida por citoquinas inflamatorias como TNF α (183). Pero a diferencia de la fractalquina, y a pesar de que sus niveles están también más elevados, CXCL16 parece no desempeñar un papel tan relevante en la respuesta inflamatoria de estos pacientes, dado que la neutralización de su función no disminuyó las interacciones leucocito-endotelio en el territorio arterial ni tampoco en el venoso. Además, el análisis por citometría de flujo no detectó diferencias en la expresión de CXCL16 y

de su receptor CXCR6 entre pacientes y controles en los diferentes subtipos leucocitarios.

Tal y como hemos descrito previamente, el papel funcional de fractalquina en la adhesividad arterial se correlaciona con un aumento de la misma en los niveles circulantes y también en la expresión de su receptor CX₃CR1 en los monocitos de los pacientes. La fractalquina unida a la membrana de las células endoteliales captura leucocitos a través de su receptor CX₃CR1, pero a través de él también interactúa con las plaquetas, activándolas y favoreciendo su adhesión al endotelio y su desgranulación con la expresión de P-selectina. Esta demostrada la asociación entre cierto grado de activación plaquetaria con un incremento en el desarrollo de enfermedad tromboembólica y morbilidad cardiovascular (269-271). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de cierto grado de activación plaquetaria (niveles de expresión de PAC-1 y P-selectina) en estos pacientes. Es probable, que estas diferencias pudieran llegar a ser significativas si se llevara a cabo un estudio con un mayor número de pacientes, de hecho actualmente se están reclutando mas pacientes para ampliar este estudio.

Las plaquetas participan y tiene un papel esencial en el reclutamiento y adhesión leucocitaria al endotelio. Su implicación en estos eventos ha quedado demostrada mediante la detección de agregados plaqueta-leucocito circulantes y/o adheridos en el endotelio vascular en diversas patologías (101,263, 272-275). Los complejos leucocito-plaqueta, especialmente los complejos monocito-plaqueta, tienen propiedades trombogénicas. Así, el monocito, tras activarse, tiene la capacidad de sintetizar y liberar factor tisular que, como es conocido, es la primera proteína que interviene en la activación de la cascada de la coagulación a partir de la vía extrínseca (276,

277). Pero, además, las plaquetas, que están en íntimo contacto a estos complejos, pueden aportar la superficie pro-coagulante necesaria para que se desarrolle la coagulación. Estudios previos han descrito un incremento en el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes en los pacientes con trombosis venosa (278-280).

En el presente estudio, los resultados muestran que en las condiciones en la que se disoció la unión de la plaqueta al leucocito (incubación con EDTA), la mayor adhesividad leucocitaria observada en el endotelio arterial en los pacientes disminuyó drásticamente (71,38% inhibición). Estos hallazgos, claramente nos sugieren la posible implicación de las plaquetas en el diferente comportamiento y mayor adhesividad leucocitaria al territorio arterial.

Tal y como hemos descrito anteriormente, también se observó una mayor expresión del receptor de fractalquina CX₃CR1 en los monocitos circulantes de los pacientes con respecto a los controles. Sin embargo, cuando la sangre se incubó con EDTA no se detectaron diferencias en la expresión de CX₃CR1 entre ambos grupos de estudio. Estos resultados por tanto, parecen indicar que sean las plaquetas adheridas a la superficie monocítica las responsables de la mayor expresión del receptor CX₃CR1 y de su mayor adhesividad al endotelio arterial observada en los pacientes con antecedentes de TVP. Estos hallazgos son relevantes si tenemos en cuenta que en el desarrollo de la placa aterosclerótica son los agregados plaqueta-monocito los que facilitan la migración de monocitos al espacio subendotelial, donde capturan las LDL oxidadas, se transforman en macrófagos, y atraen más leucocitos al foco aterosclerótico ampliando así la respuesta inflamatoria (102, 103).

En resumen, hemos observado que los pacientes jóvenes con antecedentes de TVP idiopática presentan un bajo grado de inflamación

sistémica que se podría manifestar a nivel arterial, siendo por tanto más propensos al desarrollo y formación de lesiones ateroscleróticas. Este estado inflamatorio se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de diferentes quimiocinas, así como en un aumento en la adhesividad leucocitaria, donde la fractalquina parece desempeñar un papel fundamental. Por tanto, la fractalquina y su receptor, podrían ser potentes dianas terapéuticas en la prevención o tratamiento del riesgo cardiovascular asociado a la trombosis venosa.

En conclusión, los pacientes con antecedentes de TVP parecen tener un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular del territorio arterial, siendo el nexo de unión entre ambas patologías la presencia de hiperactividad de mecanismos proinflamatorios, en donde la fractalquina parece tener un papel importante. Desde el punto de vista clínico, si estos pacientes requieren de una intervención con el fin de prevenir el mayor desarrollo de alteraciones cardiovasculares, es una hipótesis que deberá ser corroborada en estudios prospectivos futuros.

6. CONCLUSIONES

1.- En pacientes jóvenes con antecedentes de trombosis venosa profunda idiopática se observa un aumento en el grosor de la íntima-media carotídea, lo que podría indicar un estado de arterioesclerosis subclínica.

2.- La asociación entre patología arterial y venosa observada en estos pacientes podría ser consecuencia de un bajo grado de inflamación sistémica, detectado por el aumento en el plasma de diferentes mediadores inflamatorios.

3.- El estado proinflamatorio en estos pacientes se manifiesta además por el aumento en la adhesividad leucocitaria al endotelio arterial en respuesta a $\text{TNF}\alpha$.

4.- La quimiocina fractalquina parece desempeñar un papel funcional en la mayor adhesividad leucocitaria al endotelio arterial observada en estos pacientes.

5.- La interacción plaqueta-monocito-endotelio parece ser la responsable de la mayor adhesión leucocitaria observada a nivel arterial en los pacientes con antecedentes de trombosis venosa profunda idiopática.

6.- La quimiocina CXCL16 no está implicada en la interacción leucocito-endotelio observada en estos pacientes.

7.- El eje fractalquina/CX₃CR1, podría establecerse como una nueva diana terapéutica en la prevención o tratamiento del riesgo cardiovascular asociado a la trombosis venosa.

Dada la presencia de un mayor riesgo de patología arterial en los pacientes con antecedentes de trombosis venosa profunda, sería necesario un seguimiento estrecho posterior de los diferentes factores de riesgo cardiovascular. Si es necesaria una intervención terapéutica con el fin de prevenir el mayor desarrollo de alteraciones cardiovasculares, es una hipótesis que deberá ser corroborada en estudios prospectivos futuros.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia-Fuster MJ, Fabia MJ, Furio E, Pichler G, Redon J, Forner MJ, et al. Should we look for silent pulmonary embolism in patients with deep venous thrombosis? *BMC cardiovascular disorders*. 2014;14:178.
2. Hanson PO WL, Tibblin G, Eriksson H. . Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. *Archives of internal medicine*. 1997;157:1665-70.
3. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
4. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost*. 2007;98(4):756-64.
5. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2001;85(1):395-403.
6. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med*.1992;116(9):754-61.
7. Simmonds R, Ireland H, Lane DA, Zoller B, García de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med*. 1998;128:8-14.
8. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briet E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet*. 1993;341(8838):134-8.
9. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet*. 1993;342(8886-8887):1503-6.

10. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88(10):3698-703.
11. Simioni P PP, Zanon E, Saracino MA, Scudeller A, Villata S. Deep venous thrombosis and lupus anticoagulant. A case-control study. *Thromb Haemost*. 1996;76(2):187-9.
12. Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(7):1080-3.
13. Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991;151(5):933-8.
14. Samama MM. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. *Arch Intern Med*. 2000;160(22):3415-20.
15. Lapostolle F, Surget V, Borron SW, Desmaizieres M, Sordelet D, Lapandry C, et al. Severe pulmonary embolism associated with air travel. *N Eng J Med*. 2001;345(11):779-83.
16. Darvall KA, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. Obesity and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33(2):223-33.
17. Faber DR, de Groot PG, Visseren FL. Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Obes Rev*. 2009;10(5):554-63.
18. Heit JA SM, Mohr DN, Petterson T, O'Fallon WM, Melton LJ. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: case-control study. *Arch Intern Med*. 2000;160(6):809-15.

19. Stein PD BA, Olson RE. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *Am J Med.* 2005;118:978-80.
20. Lijfering WM CS, Naess IA, et al. The risk of venous thrombosis related to increase in body mass index is mediated by factor VIII induced APC-resistance. *Blood.* 2009;114:453.
21. Bergqvist D, Benoni G, Bjorgell O, Fredin H, Hedlundh U, Nicolas S, et al. Low-molecular-weight heparin (enoxaparin) as prophylaxis against venous thromboembolism after total hip replacement. *N Eng J Med.*1996;335(10):696-700.
22. Aaro LA, Juergens JL. Thrombophlebitis associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;109(8):1128-36.
23. Rosing J, Tans G, Nicolaes GA, Thomassen MC, van Oerle R, van der Ploeg PM, et al. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol.* 1997;97(1):233-8.
24. Prandoni P, Lensing AW, Buller HR, Cogo A, Prins MH, Cattelan AM, et al. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Eng J Med.* 1992;327(16):1128-33.
25. Imberti D, Agnelli G, Ageno W, Moia M, Palareti G, Pistelli R, et al. Clinical characteristics and management of cancer-associated acute venous thromboembolism: findings from the MASTER Registry. *Haematologica.* 2008;93(2):273-8.
26. Burstein SA. Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets.* 1997;8(2-3):93-104.
27. PP. JM. Idiopathic venous thrombosis is related to systemic inflammatory response and to increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction. 2010;29:3:226.

28. van Aken BE, Reitsma PH, Rosendaal FR. Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis. *Br J Haematol.* 2002;116(1):173-7.
29. Blann AD, Noteboom WM, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br J Haematol.* 2000;108(1):191-3.
30. Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SH, van der Ven-Jongekrijg J, van der Graaf F, Wollersheim H. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg.* 2002;35(4):701-6.
31. Poredos P JM. In patients with idiopathic venous thrombosis, interleukin-10 is decreased and related to endothelial dysfunction. *Heart vessels.* 2011; 26(6):596-602.
32. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas.* 2004;47(4):305-14.
33. CT. E. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1343-8.
34. PN. W. Platelet-mediated trigger mechanisms in the contact phase of blood coagulation. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 1987;13(1):86-94.
35. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 2004;109(22):2698-704.
36. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359(9):938-49.
37. Degano IR, Elosua R, Kaski JC, Fernandez-Berges DJ, Grau M, Marrugat J. Plaque stability and the southern European paradox. *Rev Esp Cardiol* 2013;66(1):56-62.
38. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.

39. Kannel WB MD. Perspective on systolic hypertension: the Framingham study. *Circulation*. 1980;61:1179-82.
40. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24(7):1591-601.
41. Zuanetti G LR MA, Santoro L, Franzoi MG. On behalf of GISSI-2 investigators. Influence of diabetes mortality in acute myocardial infarction: data from the GISSI-2 study. *J Am Coll Cardiol*. 1995;22:1788-94.
42. Mak KH MD, Granger CB, Miller DP, Wuite HD, et al. . Influence of diabetes mellitus on clinical outcome in the thrombolytic era of acute myocardial infarction. GUSTO-I Investigators. Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(1):171-9.
43. MB ZA. Obesity as cardiovascular risk factor. *Hypertension*. 2005;22.
44. Rajat SB AJ DS, Lesley-Jane ER. Smoking is associated with altered endothelial-derived fibrinolytic and antithrombotic factors. *Circulation*. 2002;106:905-8.
45. EG L. Cardiovascular regulatory mechanism in advanced age: Physiological reviews. *Circulation*. 1993;73(2):413-67.
46. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation*. 2008;117(1):93-102.
47. Hansson PO EH, Welin L, Svardsudd K, Wilhelmsen L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men: "the study of Men Born in 1913". *Arch Intern Med*. 1999;159:1886-90.

48. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost.* 2003;89(3):493-8.
49. Pomp ER, ICS, Rosendaal FR, Doggen CJ. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol.* 2007;139 (2):289-96.
50. Ageno W, Prandoni P, Romualdi E, Ghirarduzzi A, Dentali F, Pesavento R, et al. The metabolic syndrome and the risk of venous thrombosis: a case-control study. *J Thromb Haemost.* 2006;4(9):1914-8.
51. Hong C, Zhu F, Du D, Pilgram TK, Sicard GA, Bae KT. Coronary artery calcification and risk factors for atherosclerosis in patients with venous thromboembolism. *Atherosclerosis.* 2005;183(1):169-74.
52. Heit JA. Venous thromboembolism epidemiology: implications for prevention and management. *Semin thromb Haemost.* 2002;28
53. Ay C, Tengler T, Vormittag R, Simanek R, Dorda W, Vukovich T, et al. Venous thromboembolism: a manifestation of the metabolic syndrome. *Haematologica.* 2007;92(3):374-80.
54. Dentali F SA, Ageno W. The metabolic syndrome as a risk factor for venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Haemost.* 2009;35(5):451-7.
55. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, Heckbert SR, Jacobs DR, Jr., Rosamond WD, et al. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *J Thromb Haemost.* 2009;7(5):746-51.
56. Colwell JA NR. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischaemic events. *Diabetes care.* 2003;26:2181-8.
57. Vinik AI ET, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:1476-85.

58. Ferroni P BS, Falco A, David G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1282-91.
59. JS Y. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance:evidence of a common antecedent? *Diabetes care.* 1999;22
60. Sakkinen PA WP, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol.* 2000;15:897-907.
61. Carmassi F, Morale M, Puccetti R, De Negri F, Monzani F, Navalesi R, et al. Coagulation and fibrinolytic system impairment in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Res.* 1992;67(6):643-54.
62. Tsai AW CM, Rosamond WD, Heckbert SR, Polack JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med.* 2002;162(10):1182-9.
63. Heit JA LC, Ashrani AA, PettersonTM, Bailey KR, Melton LJ III. Is diabetes mellitus an independent risk factor for venous thromboembolism?: a population- based case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29 (9):1399-405.
64. Petrauskine V FM, Waernbaum I, Norberg M, Eriksson JW. The risk of venous thromboembolism is markedly elevated in patients with diabetes. *Diabetologia.* 2005;48:1017-21.
65. Vaya A MY, Ferrando F, Contreras M, Estelles A, Espana F, et al. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol.* 2002;118(1):255-9.
66. Marcucci R LA CA, et al. Increased levels of lipoprotein(a) and the risk of idiopathic and recurrent venous thromboembolism. *Am J Med.* 2003;115:601-5.

67. Doggen CJ, Smith NL, Lemaitre RN, Heckbert SR, Rosendaal FR, Psaty BM. Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(10):1970-5.
68. Deguchi H PN, Elias DJ, Averell PM, Griffin JH. High density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation.* 2005;112:893-9.
69. Eichinger S PN, Hron G, Deguchi H, Schemper M, Kyrle PA, Griffin JH. High-density lipoprotein and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Circulation.* 2007;115:1609-14.
70. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ.* 1994;309(6959):901-11.
71. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol.* 2008;83(2):97-102.
72. Holst AG, Jensen G, Prescott E. Risk factors for venous thromboembolism: results from the Copenhagen City Heart Study. *Circulation.* 2010;121(17):1896-903.
73. Severinsen MT, Kristensen SR, Johnsen SP, Dethlefsen C, Tjønneland A, Overvad K. Smoking and venous thromboembolism: a Danish follow-up study. *J Thromb Haemost.* 2009;7(8):1297-303.
74. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1996;125(1):1-7.
75. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Eng J Med.* 2003;348(15):1435-41.

76. Becattini C, Agnelli G, Prandoni P, Silingardi M, Salvi R, Taliani MR, et al. A prospective study on cardiovascular events after acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2005;26(1):77-83.
77. Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost*. 2010;103(1):56-61.
78. Prandoni P, Ghirarduzzi A, Prins MH, Pengo V, Davidson BL, Sorensen H, et al. Venous thromboembolism and the risk of subsequent symptomatic atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2006;4(9):1891-6.
79. Jezovnik M, Poredos P, Lusa L. Idiopathic Venous Thrombosis is associated with preclinical atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:304-31.
80. Libertiny G, Hands L. Lower limb deep venous flow in patients with peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*. 1999;29(6):1065-70.
81. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med*. 1999;340(2):115-26.
82. Cotran RS. Acute and chronic inflammation. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease* (6th ed) WB Saunders. 1999:57-100.
83. Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol*. 1997;34(4):327-35.
84. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):678-89.
85. Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty DM, Granger DN, Eppihimer MJ, Kubes P. Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol*. 1999;162(2):1137-43.

86. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
87. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993; 91(2):379-87.
88. Konstantopoulos K, Kukreti S, Smith CW, McIntire LV. Endothelial P-selectin and VCAM-1 each can function as primary adhesive mechanisms for T cells under conditions of flow. *J Leukoc Biol.* 1997;61(2):179-87.
89. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med.* 1996;184(1):81-92.
90. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol.* 1992;117(4):895-902.
91. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84(7):2068-101.
92. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11-25.
93. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76(2):301-14.
94. Reinhardt PH, Kubes P. Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood.* 1998;92(12):4691-9.
95. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol.* 1994; 152 (7)
96. Sullivan GW, Lee DD, Ross WG, DiVietro JA, Lappas CM, et al. Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta

- 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2004;75(1):127-34.
97. Deanfield J HJ, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction. *Testing Clin Relevance Circulation* 2007;115:1285-95.
98. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling.* 2008;10.
99. McGettrick HM, Filer A, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB. Modulation of endothelial responses by the stromal microenvironment: effects on leucocyte recruitment. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1161-2.
100. Ramcharan KS, Lip GY, Stonelake PS, Blann AD. The endotheliome: a new concept in vascular biology. *Thromb Res.* 2011;128(1):1-7.
101. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost.* 2015;113(6):1224-35.
102. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2331-6.
103. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (9):1467-71.
104. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013;201(6):785-96.
105. Sorrentino S, Studt JD, Medalia O, Tanuj Sapra K. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function. *J Cell Biol.* 2015;94(3-4):129-38.

106. Jennings LK, Saucedo JF. Antiplatelet and anticoagulant agents: key differences in mechanisms of action, clinical application, and therapeutic benefit in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2008;23(4):302-8.
107. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood*. 1993;7(1):52-62.
108. Díaz-Ricart ME, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. Barcelona: Mosby/Doyma. 1995.
109. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*. 1996;88(3):907-14.
110. Luscher EF, Weber S. The formation of the haemostatic plug: a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. *Thromb Haemost*. 1993;70(2):234-7.
111. Santoro SA ZM. The $\alpha 2\beta 1$ integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost*. 1995;74:813-21.
112. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
113. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*. 1989;264(13):7576-83.
114. Warner TD. Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells. *Int Angiol*. 1996;15(2):93-9.
115. Thornber K, McCarty OJ, Watson SP, Pears CJ. Distinct but critical roles for integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ in platelet lamellipodia formation on fibrinogen, collagen-related peptide and thrombin. *FEBS J*. 2006; 273(22):5032-43.

116. JJ H. Adhesive interactions in blood cells and vascular wall in hemostasis and thrombosis. In: Colman RW, Hirsch J, Mader V, Salzman E, editors Hemostasis and thrombosis Basic Principles and clinical Practice 3 ed Philadelphia: JB Lippincott.1994: 639-53.
117. Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):576-84.
118. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Eng J Med.* 1993; 328(9):628-35.
119. Jung SM, Moroi M. Activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha(2)\beta(1)$: its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10(7):285-92.
120. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):189-97.
121. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 1993; 7(6):516-22.
122. López A MC. Plaquetas: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013; 13:2-7.
123. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(11):2317-26.
124. Agiolilo DJ FJ. Inhibición del receptor plaquetario P2Y₁₂ de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:60-76.

125. Arya M, Lopez JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, et al. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost.* 2003;1(6):1150-7.
126. Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIbbeta 3. *J Biol Chem.* 2002;277(14):11949-56.
127. Woulfe D YJ, Prevost N, O'Brien P, Brass LF. Signal transduction during initiation extension and perpetuation of platelet plug formation. In: Meichelson AD, editor *Platelets* San Diego: Academic Press. 2002: 197-213.
128. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med.* 1998; 187(3):329-39.
129. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 1995; 86(12):4417-21.
130. Linden MD FM. Monocyte-platelet aggregates in patients with ischemic heart disease. In: Morrow DA, Cannon C, editors *Contemporary cardiology: cardiac biomarkers in the management of cardiovascular disease* Totowa, NJ: Human Press. 2005:487-93.
131. Tabuchi A, Kuebler WM. Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascul Pharmacol.* 2008;49(4-6):141-50.
132. Barnard MR, Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Li Y, Fox ML, Furman MI, et al. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays

- of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost.* 2005;3(11):2563-70.
133. JH H. Platelet structure. In: Michelson AD, editor *Platelets* San Diego: Academic in press. 2002:p.37-52.
134. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3378-84.
135. Hawrylowicz CM HG, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med.* 1991:785-90.
136. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood.* 1994;84(12):4242-8.
137. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6696):894-7.
138. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998; 187(4):601-8.
139. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2000;148:75-85.
140. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation.* 2002;106(12):1523-9.

141. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2005; 105(3):924-30.
142. Bazzoni F BB. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334:1717-25.
143. Harker LA, Hanson SR. Platelet factors predisposing to arterial thrombosis. *Bailliere's clinical haematology*. 1994;7(3):499-522.
144. Slungaard A, Fernandez JA, Griffin JH, Key NS, Long JR, Piegors DJ, et al. Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo. *Blood*. 2003;102(1):146-51.
145. Eslin DE, Zhang C, Samuels KJ, Rauova L, Zhai L, Niewiarowski S, et al. Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood*. 2004;104(10):3173-80.
146. Sachais BS, Kuo A, Nassar T, Morgan J, Kariko K, Williams KJ, et al. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood*. 2002;99(10):3613-22. E
147. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6187-93.
148. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2001;58(1):4-43.
149. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-4.

150. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004;104(1):100-6.
151. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willwbrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002;100(12):4033-9.
152. Gurbel PA, O'Connor CM, Dalesandro MR, Serebruany VL. Relation of soluble and platelet P-selectin to early outcome in patients with acute myocardial infarction after thrombolytic therapy. *Am J Cardiol*. 2001;87(6):774-7.
153. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2003;24(24):2166-79.
154. Tarnow I, Michelson AD, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Aasted B, Jensen BR, et al. Nephropathy in type 1 diabetes is associated with increased circulating activated platelets and platelet hyperreactivity. *Platelets*. 2009;20(7):513-9.
155. Zeiger F, Stephan S, Hoheisel G, Pfeiffer D, Ruehlmann C, Kokschi M. P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease. *Blood coagul Fibrinolysis*. 2000;11(8):723-8.
156. Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N, Gawaz M. Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(1):205-7.

157. Tantry US, Bliden KP, Suarez TA, Kreutz RP, Dichiara J, Gurbel PA. Hypercoagulability, platelet function, inflammation and coronary artery disease acuity: results of the Thrombotic Risk Progression (TRIP) study. *Platelets*. 2010;21(5):360-7.
158. Serebruany UR MA, Ong S, et al. Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2008; 25:207-13.
159. Nishibori M CB, McNicol A, et al. The protein CD63 in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak Syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest*. 1993;91 1775-82.
160. Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T, Muller R. Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene*. 1999;227(1):55-62.
161. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*. 1994;134(6):2645-57.
162. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(4):H959-74.
163. Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436-45.
164. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998; 392(6676):565-8.
165. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Eklund EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 1998;391(6669):799-803.

166. Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, et al. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol.* 1995;155(1):203-9.
167. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91(4):521-30.
168. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol.* 2001;166(8):5145-54.
169. Nomiya H. [Novel chemokines identified through bioinformatics]. *Seikagaku.* 1998;70(7):558-61.
170. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):34-40.
171. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 2001;276(41):37993-8001.
172. Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):694-703.
173. Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006;78(1):24-46.
174. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385(6617):640-4.

175. Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, et al. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood*. 2004;103(2):407-12.
176. Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, et al. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*. 2000; 275(52):40663-6.
177. Zivkovic M, Djuric T, Stojkovic L, Jovanovic I, Koncar I, Davidovic L, et al. CXCL16 haplotypes in patients with human carotid atherosclerosis: preliminary results. *J Atheroscler Thromb*. 2015; 22(1):10-20.
178. Zhen J, Li Q, Zhu Y, Yao X, Wang L, Zhou A, et al. Increased serum CXCL16 is highly correlated with blood lipids, urine protein and immune reaction in children with active nephrotic syndrome. *Diagn Pathol*. 2014;9:23.
179. Lehrke M, Millington SC, Lefterova M, Cumaranatunge RG, Szapary P, Wilensky R, et al. CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(4):442-9.
180. Lundberg GA, Kellin A, Samnegard A, Lundman P, Tornvall P, Dimmeler S, et al. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene. *J Intern Med*. 2005; 257(5):415-22.
181. Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, Elewa U, Sanchez-Nino MD, Carrero JJ, et al. CXCL16 in kidney and cardiovascular injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(3):317-25.
182. Grough PJ GK, Wille PT, Richlewski M, et al. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell

- Surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol.* 2004; 172:3678-85.
183. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, et al. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol.* 2004;172:6362-72.
184. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, et al. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest.* 2001; 107(5):595-601
185. Kang S, Yang C, Luo R. LysoPtdOH enhances CXCL16 production stimulated by LPS from macrophages and regulates T cell migration. *Lipids.* 2008;43(11):1075-83.
186. Barlic J, Zhu W, Murphy PM. Atherogenic lipids induce high-density lipoprotein uptake and cholesterol efflux in human macrophages by up-regulating transmembrane chemokine CXCL16 without engaging CXCL16-dependent cell adhesion. *J Immunol.* 2009;182(12):7928-36.
187. van der Voort VV, de Witte TM et al. An alternatively spliced CXCL16 isoform expressed by dendritic cells is secreted chemoattractant for CXCR6+cell. *J Leukoc Biol.* 2010; 87:1029-39.
188. Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cell and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(4):1187-93.
189. Zhang L, Ran L, Garcia GE, Wang XH, Han S, Du J, et al. Chemokine CXCL16 regulates neutrophil and macrophage infiltration into

injured muscle, promoting muscle regeneration. *Am J Pathol.* 2009; 175(6):2518-27.

190. Hara T, Katakai T, Lee JH, Nambu Y, Nakajima-Nagata N, Gonda H, et al. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int Immunol.* 2006;18(2):301-11.

191. Xiao G, Wang X, Wang J, Zu L, Cheng G, Hao M, et al. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms. *Oncotarget.* 2015.

192. Zlotnok A BA, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2001;11:597-606.

193. Sheikine Y, Sirsjo A. CXCL16/SR-PSOX--a friend or a foe in atherosclerosis? *Atherosclerosis.* 2008;197(2):487-95.

194. Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U, et al. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):750-5.

195. Garcia GE, Truong LD, Li P, Zhang P, Johnson RJ, Wilson CB, et al. Inhibition of CXCL16 attenuates inflammatory and progressive phases of anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1485-96.

196. Hofnagel O, Luechtenborg B, Eschert H, Weissen-Plenz G, Severs NJ, Robenek H. Pravastatin inhibits expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a new pleiotropic effect of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):604-10.

197. Galkina E, Harry BL, Ludwig A, Liehn EA, Sanders JM, Bruce A, et al. CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing,

interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall. *Circulation*. 2007;116(16):1801-11.

198. Gleissner CA vHP, Ley K Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1920-7.

199. Borst O, Munzer P, Gatidis S, Schmidt EM, Schonberger T, Schmid E, et al. The inflammatory chemokine CXC motif ligand 16 triggers platelet activation and adhesion via CXC motif receptor 6-dependent phosphatidylinositide 3-kinase/Akt signaling. *Circ Res*. 2012; 111(10): 1297-307.

200. Seizer P, Stellos K, Selhorst G, Kramer BF, Lang MR, Gawaz M, et al. CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2011;105(6):1112-4.

201. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 2003;101(7):2661-6.

202. Cosemans JM, Munnix IC, Wetzker R, Heller R, Jackson SP, Heemskerk JW. Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood*. 2006;108(9):3045-52.

203. Kuhar MB. Update on managing hypercholesterolemia. The new NCEP guidelines. *Aaohn J*. 2002;50(8):360-4.

204. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007;25(6):1105-87.

205. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Desvarieux M, et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis*. 2004;18(4):346-9.

206. Raveche E AF, Yuan Y, Salerno E, Kasar S, Marti GE. Introduction to Flow Cytometry. *Flow Cytometry in Drug Discovery and Development*. 2011;3-21.
207. Li X, van der Meer JJ, van der Loos CM, Ploegmakers HJ, de Boer OJ, de Winter RJ, et al. Microvascular endoglin (CD105) expression correlates with tissue markers for atherosclerotic plaque vulnerability in an ageing population with multivessel coronary artery disease. *Histopathology*. 2012;61(1):88-97.
208. Imaizumi T, Matsumiya T, Fujimoto K, Okamoto K, Cui X, Ohtaki U, et al. Interferon-gamma stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med*. 2000;192(2):127-39.
209. Rius C, Company C, Piqueras L, Cerda-Nicolas JM, Gonzalez C, Servera E, et al. Critical role of fractalkine (CX3CL1) in cigarette smoke-induced mononuclear cell adhesion to the arterial endothelium. *Thorax*. 2013;68(2):177-86.
210. Apostolakis S, Krambovitis E, Vlata Z, Kochiadakis GE, Baritaki S, Spandidos DA. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators. *Thromb Res*. 2007;121(3):387-95.
211. von Hundelshausen P, Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Frontiers in physiology*. 2014;5:294.
212. Ma A, Pan X, Xing Y, Wu M, Wang Y, Ma C. Elevation of serum CXCL16 level correlates well with atherosclerotic ischemic stroke. *AMS*. 2014;10(1):47-52.
213. Amato M, Montorsi P, Ravani A, Oldani E, Galli S, Ravagnani PM, et al. Carotid intima-media thickness by B-mode ultrasound as surrogate of

- coronary atherosclerosis: correlation with quantitative coronary angiography and coronary intravascular ultrasound findings. *Eur Heart J*. 2007;28(17):2094-101.
214. Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, et al. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):267-74.
215. Kasper B, Brandt E, Ernst M, Petersen F. Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood*. 2006;107(5):1768-75.
216. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768-76.
217. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008;111(11):5271-81.
218. Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B. Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J Leukoc Biol*. 2005;78(6):1318-26.
219. Erbel C, Wolf A, Lasitschka F, Linden F, Domschke G, Akhavanpoor M, et al. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol*. 2015;186:219-25.
220. Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, et al. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS one*. 2014;9(1):e86273.
221. Boroujerdi A, Welser-Alves JV, Tigges U, Milner R. Chronic cerebral hypoxia promotes arteriogenic remodeling events that can be

- identified by reduced endoglin (CD105) expression and a switch in beta1 integrins. *J Cereb blood Floww Metab.* 2012;32(9):1820-30.
222. Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood.* 2013;121(2):403-15.
223. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;699:1-29.
224. Sorensen HT, Horvath-Puho E, Sogaard KK, Christensen S, Johnsen SP, Thomsen RW, et al. Arterial cardiovascular events, statins, low-dose aspirin and subsequent risk of venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Hameost.* 2009;7(4):521-8.
225. Milan M, Vedovetto V, Bilora F, Pesavento R, Prandoni P. Further evidence in support of the association between venous thrombosis and atherosclerosis: a case-control study. *Thromb Res.* 2014;134(5):1028-31.
226. Belaj K, Hackl G, Rief P, Eller P, Brodmann M, Gary T. Changes in lipid metabolism and extension of venous thromboembolism. *Ann Nutr Metab.* 2014;64(2):122-6.
227. Berger JS, Rockman CB, Guyer KE, Lopez LR. Proatherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I complexes in arterial and venous disease. *J Immunol Res.* 2014;2014:234316.
228. Garcia Raso A, Ene G, Miranda C, Vidal R, Mata R, Llamas Sillero MP. Association between venous thrombosis and dyslipidemia. *Medicina clinica.* 2014;143(1):1-5.
229. Hasegawa M, Sato S, Echigo T, Hamaguchi Y, Yasui M, Takehara K. Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX3CR1 in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(1):21-8.
230. Ikejima H, IT, Tsujioka H, Kashiwagi M, Kuroi A, Tanimoto T, Kitabata H, Ishibashi K, Komukai K, Takeshita T, Akasaka T.

Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris. *Circ J*. 2010;74(2):337-45.

231. Damas JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, et al. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2567-72.

232. Yajima N KT, Isozaki T. Elevated levels of soluble fractalkine in active systemic lupus erythematosus: potential involvement in neuropsychiatric manifestations. *Arthritis Rheum*. 2005;52:1670-5.

233. Sawai H PY, Roberson J, Imai T, Goronsy JJ, Weyand CM T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1392-401).

234. Bjerkeli V, Damas JK, Fevang B, Holter JC, Aukrust P, Froland SS. Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis: possible role in vascular inflammation. *Rheumatology*. 2007;46(9):1422-7.

235. Edsfeldt A, Grufman H, Ascitutto G, Nitulescu M, Persson A, Nilsson M, et al. Circulating cytokines reflect the expression of pro-inflammatory cytokines in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):443-9.

236. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. 2001;89(5):401-7.

237. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has

- impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1241-50.
238. Zerneck AS, E, Webwer C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1897-908.
239. Jansson AM, Hartford M, Omland T, Karlsson T, Lindmarker P, Herlitz J, et al. Multimarker risk assessment including osteoprotegerin and CXCL16 in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):3041-9.
240. Wang KD, Liu ZZ, Wang RM, Wang YJ, Zhang GJ, Su JR, et al. Chemokine CXC Ligand 16 serum concentration but not A181V genotype is associated with atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta*. 2010;411(19-20):1447-51.
241. Qin M, Guo Y, Jiang L, Wang X. Elevated levels of serum sCXCL16 in systemic lupus erythematosus; potential involvement in cutaneous and renal manifestations. *Clin Rheumatol*. 2014;33(11):1595-601.
242. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13835-40.
243. Jilma B, Fasching P, Ruthner C, Rumplmayr A, Ruzicka S, Kapiotis S, et al. Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost*. 1996;76(3):328-32.
244. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, et al. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation*. 2003;108(5):524-9.
245. Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, et al. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke*. 2006;37(9):2283-7.

246. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2000;101(19):2290-5.
247. Ramacciotti E BS, Hawley AE, Vandy F, Ballard-Lipka N, et al. Elevation of soluble P-selectin as a marker for the diagnosis of deep venous thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011;17:425-31.
248. Gremmel T, Ay C, Seidinger D, Pabinger I, Panzer S, Koppensteiner R. Soluble p-selectin, D-dimer, and high-sensitivity C-reactive protein after acute deep vein thrombosis of the lower limb. *J Vasc Surg*. 2011;54(6 Suppl):48S-55S.
249. Smith A, Quarmby JW, Collins M, Lockhart SM, Burnand KG. Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*.1999;82(6):1593-9.
250. Rectenwald JE, Myers DD, Jr., Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost*. 2005;94(6):1312-7.
251. Jezovnik MK, Poredos P. Idiopathic venous thrombosis is related to systemic inflammatory response and to increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction. *Int Angiol*. 2010;29(3):226-31.
252. Blann AD, Dobrotova M, Kubisz P, McCollum CN. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1995;74(2):626-30.
253. Antonopoulos CN, Sfyroeras GS, Kakisis JD, Moulakakis KG, Liapis CD. The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2014;133(1):17-24.

254. Ay C, Jungbauer LV, Sailer T, Tengler T, Koder S, Kaider A, et al. High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin Chem*. 2007; 53(7):1235-43.
255. Kyrle PA, Hron G, Eichinger S, Wagner O. Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2007;97(6):880-3.
256. Ay C, Simanek R, Vormittag R, Dunkler D, Alguel G, Koder S, et al. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood*. 2008;112(7):2703-8.
257. Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost*. 2003;90(6):1112-20.
258. Caimi G, Hoffmann E, Montana M, Incalcaterra E, Dispensa F, D'Amico T, et al. Plasma markers of platelet and polymorphonuclear leukocyte activation in young adults with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005;32(1):67-74.
259. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brcakova E, Kudlackova Z, et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J*. 2011;75(7):1747-55.
260. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642-9.
261. Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, et al. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during

extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):264-70.

262. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JJ, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC medicine*. 2010;8:86.

263. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.

264. Sukkar MB, Issa R, Xie S, Oltmanns U, Newton R, Chung KF. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(6):L1230-40.

265. Ahn SY, Cho CH, Park KG, Lee HJ, Lee S, Park SK, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces fractalkine expression preferentially in arterial endothelial cells and mithramycin A suppresses TNF-alpha-induced fractalkine expression. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1663-72.

266. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, et al. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J*. 2003;373(Pt 2):547-58.

267. Barlic J, Zhang Y, Murphy PM. Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner. *J Biol Chem*. 2007;282(26):19167-76.

268. Rius C, Piqueras L, Gonzalez-Navarro H, Albertos F, Company C, Lopez-Gines C, et al. Arterial and venous endothelial display differential

- functional fractalkine (CX3CL1) expression by angiotensin-II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(1):96-104.
269. Maclay JD, McAllister DA, Johnston S, Raftis J, McGuinness C, Deans A, et al. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax.* 2011;66(9):769-74.
270. Kappelmayer J, Nagy B, Jr., Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. The emerging value of P-selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(5):475-86.
271. von Hundelshausen P, Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis: clinical applications. *Frontiers in physiology.* 2014;5.
272. Schulz C, Schafer A, Stolla M, Kerstan S, Lorenz M, von Bruhl ML, et al. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation.* 2007;116(7):764-73.
273. Postea O, Vasina EM, Cauwenberghs S, Projahn D, Liehn EA, Lievens D, et al. Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1186-93.
274. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Frontiers in immunology.* 2015;6.
275. Page C PS. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol.* 2013;17: 1176-84.
276. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost.* 2014;111(4):590-7.

277. van der Meijden PE, Ozaki Y, Ruf W, de Laat B, Mutch N, Diamond S, et al. Theme 1: Pathogenesis of venous thromboembolism (and post-thrombotic syndrome). *Thromb Res.* 2015;136 Suppl 1:S3-7.
278. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JJ, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost.* 2014;12(6):860-70.
279. Kageyama K, Nakajima Y, Shibasaki M, Hashimoto S, Mizobe T. Increased platelet, leukocyte, and endothelial cell activity are associated with increased coagulability in patients after total knee arthroplasty. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4):738-45.
280. Burches B, Karnicki K, Wysokinski W, McBane RD. Immunohistochemistry of thrombi following iliac venous stenting: a novel model of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2006;96(5):618-22.