

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT D'OBSTETRÍCIA i GINECOLOGIA, PEDIATRIA,  
RADIOLOGIA i MEDICINA FÍSICA

**ESTUDI DE LA REACTIVITAT  
PLAQUETÀRIA EN LA GESTACIÓ  
NORMAL I EN ELS TRASTORNS  
HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS**

Montserrat Palacio i Riera  
Barcelona, juliol de 1995



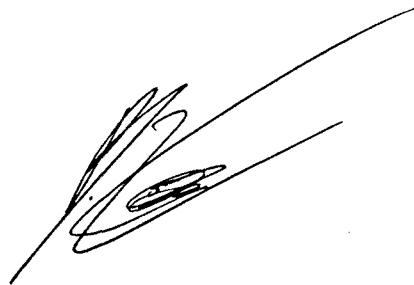
Tesi per optar al grau de Doctor, realitzada per Montserrat  
Palacio i Riera al Departament d'Obstetrícia i Ginecologia  
i al d'Hemostàsia i Hemocoagulació de l'Hospital Clínic de  
Barcelona, sota la direcció del Dr. Pere Joan Torres i Pons,  
Metge Adjunt i Professor Associat de Medicina.



PERE JOAN TORRES i PONS, Doctor en Medicina, Professor Associat de la  
Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

CERTIFICO: Que el treball "ESTUDI DE LA REACTIVITAT PLAQUETÀRIA EN LA GESTACIÓ NORMAL I EN ELS TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS", ha estat realitzat al Departament d'Obstetrícia i Ginecologia i al d'Hemostàsia i Hemocoagulació de l'Hospital Clínic de Barcelona, sota la meva direcció, per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

El Director,

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the name 'Pere Joan Torres i Pons'.

Dr. Pere Joan Torres i Pons

Barcelona, juliol de 1995



Als meus pares. Per la seva inquebrantable fe en el meu futur i el seu inesgotable suport en els moments més durs. Al meu pare, que m'ha ensenyat el valor de la perseverància, l'amor per la feina ben feta i la lluita per la família. Cavaller del futur, ha estat sempre disposat a invertir avui per recollir un demà. A la meva mare, puntal de la meva família i increïble lluitadora de la vida com a dona, professional i mare. Encara que ferma en les seves conviccions, demostra sempre un exquisit sentit del respecte pels principis dels altres, és franca i directa, sempre serena en els moments difícils i plena d'un amor incondicional per la família.

Al meu marit Ferran, company incansable d'aquest llarg viatge. El seu bon criteri i la seva opinió ha tingut un pes indiscutible en els moments decisius. El període d'estudi del MIR, la selecció de l'especialitat, l'elaboració d'aquesta tesi o la meva recent incursió a terres llunyanes són només algunes de les seves actuacions estelars. Ell és qui m'anima a treballar per una vida personal rica i plena que tingui també una vessant professional satisfactòria. Ell m'ha ensenyat a exercitar i respectar la nostra virtual independència. Amb ell comparteixo el projecte de futur més ambiciós de la meva carrera: la nostra família.

Gràcies Ferran, amic i company, per ser al meu costat.

He tingut la sort de tenir-los de companys de viatge. Ells sempre han estat amb mi per compartir les alegries i les penes que aquesta professió meva m'ha donat. Amb ells, les satisfaccions sempre han estat més grans i les preocupacions i la tristor més fàcils de suportar.

Per vosaltres, per sempre, us estimo.





## AGRAÏMENTS

Al Dr. Pere Joan Torres i Pons que, apart de guiar-me en la consecució d'aquesta tesi, ha intentat inculcar-me el sentit comú i el bon criteri en la pràctica d'aquesta especialitat. Espero que ho hagi aconseguit.

Al Dr. Bienvenido Puerto. Vull agrair-li no solament el fet de que va guiar-me en els primers passos en l'especialitat com al meu Adjunt, sinó que em va descobrir mitjançant l'ecografia, aquest altre petit i estimat pacient que és el fetus i que, en el fons, és la peça clau d'aquesta tesi.

A les meves estimades i anònimes pacients amb les que comparteixo la difícil tasca de ser dona, esposa i mare. Amb la seva sola presència han contribuït a l'elaboració d'aquest treball.

Al personal del Centre d'Extraccions de l'Hospital Clínic, i molt especialment al David i a la Montse. Per la seva desinteressada col·laboració en la recollida de les mostres. Amb el seu ajut, la meva tasca va ser més fàcil.

A la Gemma i a la Carmen, per la seva col·laboració en la selecció de pacients des del Dispensari.

Al Dr. Aleix Cases i al Dr. Esteban Poch, ambdós del Servei de Nefrologia de l'Hospital Clínic. Al primer, bàsicament per animar-me a fer la tesi, inculcant-me la convicció de que és possible fer un treball d'investigació amb una bona dosi d'esforç i treball sistemàtic. Al segon, per la seva paciència en desvetllar-me els misteris de la medicació del calci intracel·lular.

A la Dra. Júlia Ojuel, que ha il·luminat amb els números de l'estadística el que ha estat la feina de dos anys i a la qual he d'agrair que em dediqués un temps preciós quan ella estava elaborant la seva pròpia tesi.



A tot l'equip d'infermeria del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Clínic, i molt especialment al de la Sala d'Obstetrícia i a les Llevadores de Sala de Parts. Amb elles he compartit molts dels moments més remarcables, bons i dolents, de la meua carrera professional. A totes elles, com no, aquest és el moment de retre'ls-hi el meu petit homenatge.

Als meus companys de residència. Als que m'han precedit (i molt especialment a la Dra. Laura Fité), perquè em van ensenyar el que saben i als que em van seguir perquè em van permetre d'ensenyar-los el que jo havia après. A tots els altres metges del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Clínic que d'una manera o altre han col·laborat en la meua formació tant personal com professional. No hauria pogut triar millor el meu destí per fer el MIR. Aquí, amb vosaltres, he passat uns anys difícilment oblidables.

I molt especialment:

Als meus estimadíssims col·legues del Laboratori d'Hemocoagulació. A la Dra. Maribel Díaz, a les ja quasi doctores M<sup>a</sup> Goretti Gómez i Marta Carretero i a la M<sup>a</sup> Jesús Zurbán. L'estudi de l'agregació plaquetar ha estat més que amè amb el seu suport i la seva companyia. Recordo gratament les nostres converses que sovint anaven més enllà de la pura qüestió acadèmica (cosa que és d'agraïr, per variar!). Menció especial a la Montse Viñas per les seves pacients explicacions i el sentit comú en l'aplicació del treball de laboratori i com no, al Dr. Ginés Escolar que exerceix sobre tots els que treballem sota les seves ordres, un magnífic lideratge. A ell vull agrair-li el seu suport i la seva confiança en la meua capacitat de poder dur a bon port tota aquesta feina i per la simplicitat i passió en que és capaç d'explicar l'intricat món de la plaqueta.

A les llevadores Srta. Roser Vilella i Srta. Isabel Salgado, amb les que he passat moltes, moltes, moltes hores de guàrdia i que, per aquest motiu, són les que han patit i coneixen més les meves debilitats. Gràcies pel vostre sentit comú. Gràcies per les llargues converses nocturnes.



Als meus amics i col·legues Dra. Carme Comas i Dr. Josep M<sup>a</sup> Martínez. No només compartim l'entusiasme per la nostra especialitat, sinó també i més important, la voluntat de potenciar les nostres vides personals més enllà de la professió. Ells han estat, a més, un dels principals motors en la realització d'aquesta tesi. Gràcies amics meus pel vostre suport incondicional.

Als meus amics Muntsa Guasch i Jordi Martínez. A tú, Muntsa, pels teus esmorzars i sobretot per la teva companyia durant la redacció d'aquesta tesi. Gràcies infinites també, pel teu ajut en la correcció de les errades en aquesta nostra tan estimada llengua. A tú, Jordi, per l'impagable assessorament informàtic en la configuració estètica d'aquesta tesi. Als dos, per ser els meus amics.





2.- EL FUNCIONAMENT PLAQUETARI EN LA GESTACIÓ NORMAL . . .	47
2.1.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA <i>in vivo</i> EN LA GESTACIÓ NORMAL . . . . .	48
2.2.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA <i>in vitro</i> A LA GESTACIÓ NORMAL . . . . .	51
3.- FISIOPATOLOGIA DELS TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS	58
3.1.- INTRODUCCIÓ . . . . .	58
3.2.- CONCEPTE I CLASSIFICACIÓ . . . . .	60
3.3.- FISIOPATOLOGIA . . . . .	63
3.3.1.- FISIOLOGIA NORMAL DE L'ENDOTELI . . . . .	66
3.3.2.- LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL EN ELS TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS . . . . .	69
3.3.3.- LA FORMACIÓ DE RADICALS LLIURES . . . . .	72
3.3.4.- HIPÒTESI ACTUAL SOBRE L'ETIOPATOGÈNIA DE LA PREECLÀMPSIA	74
4.- MODIFICACIONS DEL COMPORTAMENT PLAQUETARI EN ELS TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS . . . . .	77
4.1.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA <i>in vivo</i> EN LA GESTACIÓ AMB TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS	79
4.2.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA <i>in vitro</i> EN LA GESTACIÓ AMB TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS	82
 HIPÒTESIS DE TREBALL . . . . .	 89
 OBJECTIUS . . . . .	 93



<b>MATERIAL i MÈTODES</b> .....	97
1.- PACIENTS .....	99
1.1.- ESTUDI LONGITUDINAL .....	100
1.2.- ESTUDI TRANSVERSAL .....	102
2.- DISSENY DE L'ESTUDI .....	103
3.- MATERIAL .....	105
3.1.- TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC .....	105
3.1.1.- MATERIAL NECESSARI .....	105
3.1.2.- PREPARACIÓ DE LA PGE <sub>1</sub> .....	105
3.1.3.- PREPARACIÓ DEL PLASMA RIC EN PLAQUETES .....	106
3.2.- CALCI INTRACEL·LULAR BASAL I POSTESTIMULACIÓ AMB TROMBINA O VASOPRESSINA .....	107
3.2.1.- MATERIAL NECESSARI .....	107
3.2.2.- PREPARACIÓ DE LA FURA-AM .....	108
3.2.3.- PREPARACIÓ DEL PLASMA RIC EN PLAQUETES .....	108
4.- MÈTODES .....	109
4.1.- OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES .....	109
4.2.- TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC .....	111
4.2.1.- BASES DELS ESTUDIS SOBRE L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA .....	111
4.2.2.- PROCEDIMENT .....	112
4.3.- CALCI INTRACEL·LULAR BASAL I POSTESTIMULACIÓ AMB TROMBINA O VASOPRESSINA .....	114
4.3.1.- BASES DE LA MESURA DE LA [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	114
4.3.2.- RENTAT DE PLAQUETES PER CENTRIFUGACIÓ .....	116
4.3.3.- PROCEDIMENT .....	117

5.- ESTUDI ESTADÍSTIC .....	120
5.1.- VARIABLES .....	120
5.2.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC .....	122
<b>RESULTATS i DISCUSSIÓ .....</b>	<b>125</b>
1.- DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ I RESULTATS PERINATALS .....	127
1.1.- POBLACIÓ EN ESTUDI i RESULTATS PERINATALS .....	127
1.2.- VARIABLES POBLACIONALS .....	132
1.2.1.- TENSÍO ARTERIAL .....	132
1.2.1.1.- Resultats tensió arterial .....	132
1.2.2.- PARÀMETRES HEMATOLÒGICS .....	134
1.2.2.1.- Resultats paràmetres hematològics .....	134
1.2.2.2.- Discussió paràmetres hematològics .....	158
1.2.3.- PARÀMETRES BIOQUÍMICS .....	162
1.2.3.1.- Resultats paràmetres bioquímics .....	162
1.2.3.2.- Discussió paràmetres bioquímics .....	192
2.- GESTACIÓ NORMAL. ESTUDI LONGITUDINAL .....	195
2.1.- TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC .....	195
2.1.1.- RESULTATS TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> .....	195
2.1.2.- DISCUSSIÓ TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> .....	199
2.2.- CALCI INTRACEL·LULAR BASAL .....	203
2.2.1.- RESULTATS CALCI BASAL .....	203
2.2.2.- DISCUSSIÓ CALCI BASAL .....	206

2.3.- CALCI POSTESTIMULACIÓ AMB TROMBINA . . . . .	210
2.3.1.- RESULTAT CALCI POSTTROMBINA . . . . .	210
2.3.2.- DISCUSSIÓ CALCI POSTTROMBINA . . . . .	213
2.4.- CALCI POSTESTIMULACIÓ AMB VASOPRESSINA . . . . .	216
2.4.1.- RESULTATS CALCI POSTVASOPRESSINA . . . . .	216
2.4.2.- DISCUSSIÓ CALCI POSTVASOPRESSINA . . . . .	219
3.- GESTACIÓ PATOLÒGICA. ESTUDI TRANSVERSAL . . . . .	221
3.1.- ESTUDI DE LA SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC . . . . .	221
3.1.1.- RESULTATS TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> . . . . .	221
3.1.2.- DISCUSSIÓ TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE <sub>1</sub> . . . . .	229
3.2.- CALCI INTRACEL·LULAR BASAL . . . . .	232
3.2.1.- RESULTATS CALCI BASAL . . . . .	232
3.2.2.- DISCUSSIÓ CALCI BASAL . . . . .	239
3.3.- CALCI POSTESTIMULACIÓ AMB TROMBINA . . . . .	242
3.3.1.- RESULTATS CALCI POSTTROMBINA . . . . .	242
3.3.2.- DISCUSSIÓ CALCI POSTTROMBINA . . . . .	249
3.4.- CALCI POSTESTIMULACIÓ AMB VASOPRESSINA . . . . .	252
3.4.1.- RESULTATS CALCI POSTVASOPRESSINA . . . . .	252
3.4.2.- DISCUSSIÓ CALCI POSTVASOPRESSINA . . . . .	259
4.- DISCUSSIÓ D'ASPECTES GLOBALS . . . . .	261
4.1.- CONSIDERACIONS GENERALS . . . . .	261
4.2.- PREDICCIÓ DE LA PREECLÀMPSIA. APLICACIÓ CLÍNICA . . . . .	271

<b>RESUM i CONCLUSIONS</b> .....	275
1.- RESUM .....	277
2.- CONCLUSIONS .....	280
2.1.- GESTACIÓ NORMAL .....	280
2.2.- GESTACIÓ PATOLÒGICA .....	281
2.3.- CONCLUSIONS GLOBALS .....	283
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	285
<b>LLISTA DE FIGURES</b> .....	309
<b>LLISTA DE TAULES</b> .....	313
<b>ABREVIATURES</b> .....	317

# **JUSTIFICACIÓ**



Tenint en compte el conjunt de la literatura, hi ha evidències que hi ha una activació plaquetària en la gestació normal i encara més en la gestació complicada amb els trastorns hipertensius de l'embaràs. Els tests *in vitro*, no sempre poden demostrar una alteració en el comportament plaquetari prèvia a la presentació de la clínica, però els estudis que es basen en els segons missatgers, semblen orientar en aquest sentit. Per altra banda, sembla lògic pensar que l'augment de la reactivitat plaquetària que té lloc fisiològicament en la gestació normal podria facilitar, si existís un altre factor com podria ser una alteració endotelial, l'inici d'un cercle viciós d'activació plaquetària que finalitzaria amb l'aparició de la clínica de la preeclàmpsia. Un estat intermig d'aquest recorregut seria la hipertensió gestacional, en el qual o bé l'organisme seria capaç de controlar els processos d'activació o bé alguns dels factors desencadenants no serien tan agressius.

Així doncs, els estudis actuals estan encaminats al coneixement de la fisiopatologia dels trastorns hipertensius de l'embaràs per poder determinar a) quina és l'etiologia o etiologies del procés i b) tests *in vitro* capaços de determinar precoçment i amb una predicció fiable quina és la pacient amb risc de patir aquests trastorns.

Com la resta d'estudis de la literatura, el treball presentat en aquesta tesi intenta, per una banda, aportar informació sobre l'alteració en els mecanismes dels segons missatgers i d'aquesta manera donar llum sobre la fisiopatologia del procés i, per altra banda, proposar un estudi *in vitro* aplicable a grans poblacions, que pugui determinar la pacient en risc de desenvolupar la patologia. De passada, els resultats d'aquest test ens poden fer entendre millor els mecanismes que condueixen a l'activació plaquetària.

Espero que aquesta tesi pugui ser un petit gra de sorra en aquest llarg camí.

\* \* \* \* \*





# **INTRODUCCIÓ**



Els trastorns hipertensius de l'embaràs (THE) són la principal causa de morbimortalitat en les gestants dels països occidentals <sup>[1]</sup>.

La literatura refereix que en la gestant normotensa i encara més en l'embarassada amb THE, existeixen canvis en el comportament de les plaquetes. Aquestes alteracions consistirien en un augment de la reactivitat plaquetària i en fenòmens d'hipercoagulabilitat que podrien fins i tot arribar a la coagulació intravascular disseminada <sup>[2]</sup>. Aquests trastorns del funcionalisme plaquetari es manifestarien clínicament de forma típica en el tercer trimestre de l'embaràs . La literatura indica, però, que ja en estadis molt inicials de la gestació (molt abans de l'aparició de la clínica), seria possible demostrar la modificació d'alguns paràmetres, que ens permetrien detectar la pacient amb un risc elevat de patir els THE <sup>[3,4]</sup>. Aquests paràmetres només es poden obtenir a través de procediments complexos, de manera que fins el moment actual, no existeixen proves senzilles i aplicables a una població àmplia per demostrar aquestes alteracions.

El marc teòric que dóna peu a aquest treball és aquesta existència (demostrable per la clínica i per medis indirectes <sup>[9,6]</sup>) de l'increment de la reactivitat plaquetària que té lloc a l'embaràs i particularment en els THE <sup>[7]</sup>. Cal dir que els THE no serien més que la manifestació exacerbada dels canvis fisiològics propis de la gestació normal, de manera que els mecanismes compensadors que actuen en l'embaràs no patològic serien insuficients per mantenir l'homeòstasi. L'origen d'aquests trastorns encara no està determinat, però podrien ser deguts a una alteració de la paret vascular, a un trastorn de la plaqueta *per se* o a la interacció dels dos factors.

La plaqueta és un corpúscul sanguini desprovist de nucli però amb sistemes d'activació i resposta similars als que fisiològicament regulen el to vascular. L'estudi del comportament plaquetari ens ofereix la possibilitat de l'estudi *in vitro* del que succeeix a la paret vascular, ja que s'accepta la plaqueta com a model experimental d'estudi de la fibra muscular llisa. Les similituds en les

característiques cel·lulars ( receptors de membrana, segons missatgers... ) i de citoesquelet d'ambdós cèl·lules permeten aquesta comparació. La plaqueta és fàcil d'obtenir, aïllar i manipular al laboratori. Així doncs, és possible que els canvis que s'objectivin *in vitro* en el seu comportament tinguin relació amb els canvis que tenen lloc *in vivo* a la paret vascular [8]. Així doncs, l'estudi del comportament plaquetari, ens pot donar indirectament informació del que succeeix en la paret vascular en la gestació normal i en els trastorns hipertensius de l'embaràs.

La mesura de la reactivitat plaquetària resulta un procediment simple quan la plaqueta és hipofuncionant. Només existeixen però, mètodes indirectes, poc específics i tardans per detectar una augment de la reactivitat plaquetària: consisteixen en la medició de metabolits d'origen plaquetari a plasma o orina (tromboxà B<sub>2</sub>, β-tromboglobulina, factor plaquetari 4...), aparició de plaquetopènia o alteracions del volum plaquetari [5,6,9,10]. Aquest treball proposa una tècnica *in vitro*, simple i aplicable a grans poblacions, que podria demostrar una alteració precoç del seu comportament.

Donat que algunes dades apunten el fet que en la gestació normal [11] i en els trastorns hipertensius de l'embaràs (THE) [12], existeix un estat d'augment de la reactivitat plaquetària i per tant d'hiperagregabilitat, utilitzarem 2 tècniques per avaluar aquest estat: 1. En el **Test de sensibilitat a la PGE<sub>1</sub>** en l'agregació plaquetària induïda per l'àcid araquidònic, avaluarem la resposta a l'agregació induïda per l'àcid araquidònic després de l'estimulació de l'adenilciclasa amb PGE<sub>1</sub> que, en sintetitzar AMPc, inhibeix l'agregació plaquetària. Segons la nostra hipòtesi, aquest test seria útil per determinar un estat d'hiperagregabilitat, ja que, en el decurs de la gestació normal i en la gestació complicada amb THE [13-15] l'agregació requeriria de dosis progressivament més elevades de PGE<sub>1</sub> per ser frenada. 2. En el **Calci intracel·lular basal i postestimulació amb trombina i vasopressina**, observarem si la disponibilitat de calci intraplaquetari basal i després de l'estimulació amb agonistes, està més elevada en algun trimestre de la

gestació normal o en pacients que presenten THE. Donat que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular representa el segon missatger de l'activació cel·lular, en la plaqueta amb reactivitat augmentada s'hauria de poder demostrar nivells elevats de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. Aquesta tècnica ha demostrat la seva utilitat en pacients amb hipertensió arterial essencial. Els estudis en la pacient embarassada i la gestant amb THE són recents i amb resultats encara contradictoris [16-22].

La necessitat de realitzar les dues tècniques vindria donada per la seva complementarietat i per estudiar dos aspectes diferents de l'activació plaquetària: el **Test de sensibilitat a la  $\text{PGE}_1$**  en l'agregació plaquetària induïda per l'àcid araquidònic tindria una evident aplicabilitat clínica pel que fa a mètode de *screening*, ja que ens oferiria els avantatges d'un mètode simple, econòmic, poc cruent i aplicable a grans poblacions. Els resultats del **Calci intracel·lular basal i postestimulació amb trombina o vasopressina** ens permetrien aprofundir en la fisiopatologia del comportament plaquetari en la gestació normal i amb THE.

\* \* \* \* \*



# **REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA**





# 1.- FISIOLOGIA DE L'HEMOSTÀSIA PRIMÀRIA

L'Hemostàsia o Sistema Hemostàtic es defineix com el conjunt de fenòmens fisiològics que desencadena l'organisme a) per detenir les hemorràgies i b) per mantenir la permeabilitat vascular.

El Sistema Hemostàtic inclou l'hemostàsia primària, la coagulació i la fibrinòlisi. Aquests processos, encara que clàssicament es descriuen d'una manera separada, estan íntimament relacionats *in vivo*. La integritat i la permeabilitat del sistema vascular depenen d'una interacció equilibrada entre les plaquetes i la paret vascular i entre els sistemes de la coagulació i la fibrinòlisi. Durant l'embaràs, tenen lloc importants canvis en el comportament del Sistema Hemostàtic, però per entendre tals fets és imprescindible conèixer els mecanismes hemostàtics en l'individu normal no gestant. Aquesta tesi estudia algunes d'aquestes modificacions, en l'hemostàsia primària, que tenen lloc en la gestant normal i en els trastorns hipertensius de l'embaràs.

L'hemostàsia primària implica bàsicament la paret vascular i les plaquetes i s'inicia quan existeix una disrupció de la monocapa de cèl·lules endotelials que cobreixen normalment la superfície íntima dels vasos sanguinis. Les plaquetes acompleixen dues funcions primordials en el procés de l'hemostàsia: aconseguir la formació d'un tap hemostàtic en el punt de lesió vascular i, a més a més, contribuir a activar el mecanisme de la coagulació a la zona lesionada. Això desembocarà en la subsegüent formació de malles de fibrina, que consolidaran el tap plaquetari.

Quan es produeix la disrupció de l'endoteli vascular, s'exposen les estructures subendotelials a les plaquetes circulants, fet que condueix al **procés d'adhesió plaquetària (interacció plaqueta-vas)**, amb la qual cosa les plaquetes obstrueixen el vas lesionat. L'adhesió plaquetària està mediada pel factor de von Willebrand (FvW), el qual s'uneix als receptors de la superfície plaquetària localitzats a la glicoproteïna Ib (GPIb) de la membrana i facilita l'adhesió de les plaquetes al subendoteli. Les plaquetes adherides sofreixen un canvi ràpid de la seva conformació discoide normal (*shape change*), transformant-se en esferes i emetent protusions citoplasmàtiques o pseudòpodes, i extenen-se sobre el subendoteli per recobrir totalment la superfície lesionada. Després de l'adhesió, les plaquetes experimenten la reacció d'alliberació, en la qual es **desgranulen**, secretant el contingut dels seus grànuls (com fibrinogen i ADP) i **també sintetitzen ràpidament tromboxà A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)**, un potent vasoconstrictor i activador de les plaquetes, derivat de l'àcid araquidònic (AA).

Els constituents dels grànuls i el TXA<sub>2</sub> alliberats actuen conjuntament en el **procés d'agregació plaquetària (interacció plaqueta-plaqueta)**, en el qual les plaquetes s'uneixen entre sí per formar un tap que obstrueix la llum del vas lesionat. El fibrinogen fa de mediador en l'agregació (així com el FvW ho fa en l'adhesió plaquetària) unint-se als seus receptors específics de la superfície plaquetària localitzats en el complex glicoproteic IIB-IIIa de la membrana (GPIIb-IIIa). Paral·lelament a la reacció de secreció plaquetària, es manifesta l'activitat procoagulante de les plaquetes, que desencadena la cascada de la coagulació <sup>[23]</sup> i condueix a la formació de fibrina, que consolida l'agregat plaquetari (hemostàsia secundària). Les plaquetes contribueixen a l'**activació de la cascada de la coagulació** de diferents formes. A més, la trombina generada durant la cascada de la coagulació no només catalitza el pas de fibrinogen a fibrina sinó que és un potent activador de l'agregació plaquetària.

La influència dels components sanguinis sobre l'hemostàsia primària ha estat menys estudiada. En general, els dèficits dels factors de la coagulació no semblen influir excessivament en ella. Contràriament, els elements formes de la sang, en especial els glòbuls rojos, tenen una influència bàsica en l'hemostàsia primària i els hematòcrits inferiors al 30% dificulten clarament la interacció plaquetes-subendoteli <sup>[24]</sup>.

El procés hemostàtic conclou amb la retracció de les bandes de fibrina (retracció del coàgul) i amb la reabsorció paulatina del trombus format mitjançant els mecanismes de fibrinòlisi que mantindran la permeabilitat vascular.

Vegem doncs, a continuació, quines són l'estructura i la funció de cada una de les parts que col·laboren en aquest procés.

## 1.1.- PARET VASCULAR

Clàssicament els vasos sanguinis s'havien considerat com un sistema inert, l'única missió dels quals era el transport de la sang als diferents òrgans. El coneixement més exhaustiu de la fisiologia del sistema vascular ha posat de relleu el paper primordial que la paret vascular té en el manteniment de l'equilibri del sistema hemostàtic i la importància d'algunes de les seves funcions específiques.

### 1.1.1.- ESTRUCTURA

La paret dels vasos sanguinis es pot dividir en tres parts: l'íntima, la capa mitjana i l'adventícia. Dependent del tipus de vas, el gruix i la composició d'aquestes capes varia. La **capa íntima** és la més interna i està limitada per fora per la membrana elàstica interna. A la capa íntima trobem una capa contínua de **cèl·lules endotelials** que contacten directament amb la sang circulant. Aquestes cèl·lules presenten una morfologia poligonal i es disposen en un patró característic "en empedrat". Les cèl·lules estan unides per diversos sistemes d'anclatge que varien dependent del territori vascular. La cèl·lula endotelial té diverses organelles citoplasmàtiques que inclouen mitocondries, microtúbuls i abundants vesícules de pinocitosi. Aquestes vesícules són les responsables del transport de diverses substàncies des de la llum del vas als teixits i *viceversa*. Les cèl·lules endotelials contenen a més a més unes organelles característiques en forma de bastó, que s'anomenen cossos de Weibel-Palade, que són el lloc de dipòsit del factor de von Willebrand (FvW) <sup>[25]</sup>.

L'àrea de sota l'endoteli es coneix com **subendoteli**. Morfològicament, està constituït per la membrana basal, que serveix de suport a l'endoteli suprajacent, elastina, que continua amb la membrana elàstica interna i microfibril·les, que

s'orienten paral·leles a l'eix longitudinal del vas. Pel que fa a la composició química, en el subendoteli hi trobem: **colagen, laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, factor de von Willebrand i proteoglicans.**

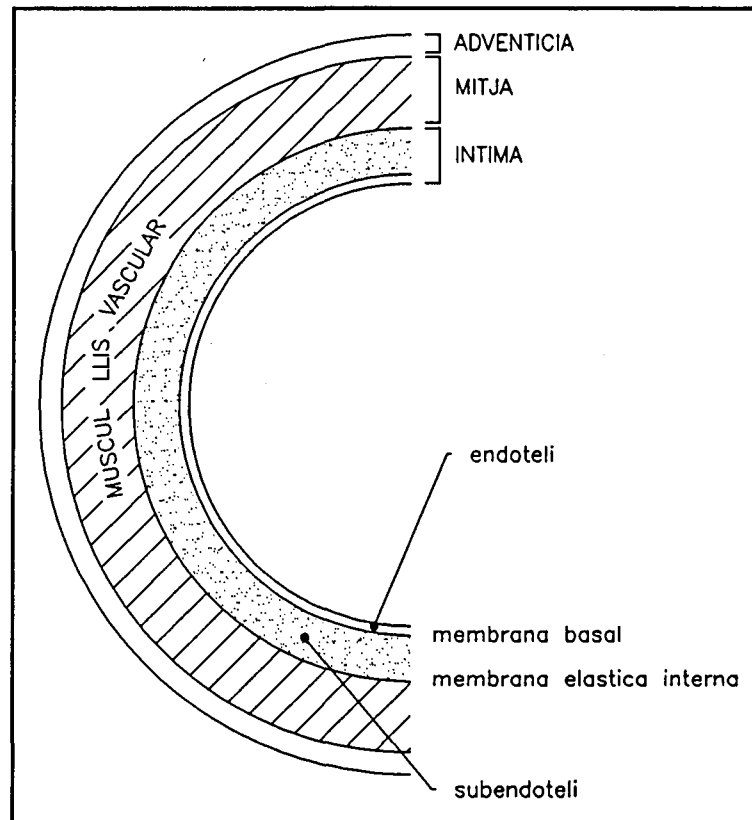


Figura 1. Estructura de la paret vascular

Amb tècniques de cultiu de la cèl·lula endotelial, s'ha demostrat que aquestes cèl·lules són capaces de sintetitzar *in vitro* una matriu extracel·lular idèntica a la que trobem *in vivo* [26]. Això ha permès desenvolupar un model experimental en el qual s'estudia sota condicions de flux la reactivitat dels components del subendoteli enfront diferents components hemàtics, tant cel·lulars com plasmàtics.

La membrana elàstica interna constitueix el límit entre l'íntima i la capa mitjana. Els components d'aquesta membrana són cèl·lules musculars llises a les arterioles i elastina a les venes. La **capa mitjana** està composta per cèl·lules musculars llises, fibres elàstiques en proporció variable, fibres de colages i, ocasionalment, fibroblastes. L'**adventícia** és la capa més externa dels vasos i està constituïda principalment per teixit connectiu: fibres col·làgenes i elàstiques. Serveix d'anclatge dels vasos al teixit circumdant i a través seu hi arriben els nervis i els *vasa vasorum*, que arriben fins a la capa mitjana i nodreixen la paret dels vasos.

### 1.1.2.- FISIOLOGIA

La paret vascular i essencialment l'endoteli juga un important paper en l'hemostàsia. Això és degut a que l'endoteli sintetitza i allibera múltiples molècules d'importància capital per l'adhesió plaquetària, la coagulació i la fibrinòlisi. Algunes d'aquestes molècules tenen propietats protrombòtiques mentre que d'altres tenen capacitats antitrombòtiques ( Taula 1 ).

#### PROPIETATS PROTROMBÒTIQUES

PAF  
Factor tissular  
Factor de von Villebrand  
Factor V  
Fibronectina  
Trombospondina  
PAI-1

#### PROPIETATS ANTITROMBÒTIQUES

PGI<sub>2</sub>  
Trombomodulina  
Proteïna S  
Activador tissular del plasminogen (t-PA)  
Receptors fibrinòlisi  
Glicosaminoglicans  
Factor relaxant vascular  
(EDRF)-òxid nítric

Taula 1.- Molècules sintetitzades per l'endoteli

També s'ha observat que el metabolisme de les cèl·lules endotelials és de gran transcendència en la regulació dels diferents processos fisiològics i patològics. Així, el metabolisme dels àcids grassos a través de les vies de la ciclo i lipooxigenasa, amb la producció d'eicosanoids, s'ha relacionat amb el manteniment del balanç

hemostàtic (metabòlits de la via de la ciclooxigenasa) i amb la regulació de les propietats adhesives de les cèl·lules (metabòlits de la via de la lipooxigenasa). Aquests aspectes seran comentats més àmpliament en un capítol posterior. En resum, els mecanismes que garantitzen la no-trombogènesi de l'endoteli són:

- La disposició d'una superfície cel·lular rica en glicosaminoglicans del tipus heparinoide.
- La capacitat de les cèl·lules endotelials de sintetitzar PGI<sub>2</sub> que és el principal metabòlit vascular de l'àcid araquidònic.
- La síntesi de 13-HODE, metabòlit de l'àcid linoleic a través de la via de la lipooxigenasa. Aquest metabòlit regularia l'expressió de proteïnes adhesives en la superfície plaquetària. La lesió endotelial comportaria canvis en la disponibilitat del substrat, amb la producció de 15-HETE, que té propietats proadhesives.

Recentment s'ha identificat altres molècules sintetitzades per l'endoteli que intervenen en el to vascular: el factor relaxant derivat de l'endoteli que sembla ser l'òxid nítric, amb una potent acció vasodilatadora i l'endotelina 1 que és l'agent hipertensor més potent conegut.

## 1.2.- PLAQUETES

Les plaquetes són fragments de citoplasma anucleats originats en el moll de l'os **a partir dels megacariòcits**. Són els elements formes més petits de la sang, de 3 a 5 µm i amb una vida mitjana de 7 dies. En repòs tenen forma de disc biconvex i normalment circulen a prop de la paret en ser desplaçats per les hematies que circulen pel centre dels vasos.

### 1.2.1.- ESTRUCTURA

Les plaquetes presenten una estructura molt complexa. Per tal de relacionar aquesta estructura amb la seva activitat funcional, considerarem quatre zones fonamentals: la zona perifèrica, la zona sol-gel, la zona de les organel·les i el sistema de membranes <sup>[35]</sup>.

La **zona perifèrica** està formada pel recobriment extern o glicocàlix, la membrana citoplasmàtica i la regió submembranosa. El **glicocàlix** envolta completament la plaqueta i constitueix un component important de la membrana plaquetària. Les glicoproteïnes de membrana actuen com a receptors i faciliten la transmissió dels estímuls a través de la membrana plaquetària. La glicoproteïna Ib (GPIb) és el receptor del factor de von Willebrand (FvW), que intervé en l'adhesió de les plaquetes al subendoteli. El complex glicoproteic Ib-IIIa (GPIb-IIIa) funciona com a receptor del fibrinogen, fibronectina i factor de von Willebrand i intervé en l'agregació plaquetària. La GPIa, junt amb la GPIIa, actua com a receptor pel col·lagen del subendoteli. A més a més, hi ha receptors pel difosfat d'adenosina (ADP), trombina, epinefrina i serotonina <sup>[29]</sup>. La **membrana citoplasmàtica**, al igual d'altres membranes cel·lulars, té naturalesa lipoproteica i està constituïda per una bicapa lipídica i proteïnes que s'extenen a ambdós costats; la porció de



de membrana serveix com a superfície d'encaixament per les diverses proteïnes que intervenen en la coagulació <sup>[30]</sup>. S'ha demostrat que l'àcid gras majoritari en els fosfolípids de les plaquetes és l'àcid araquidònic (AA) <sup>[31]</sup>: la fosfatidiletanolamina conté un 49-55% de l'araquidonat total, la fosfatidilcolina un 26-31% i el fosfatidilinositol aporta el 14-25% restant <sup>[32]</sup>. L'àcid araquidònic juga un paper molt important en el funcionalisme plaquetari, ja que és el precursor de la biosíntesi de les prostaglandines. La membrana plaquetària té també activitat

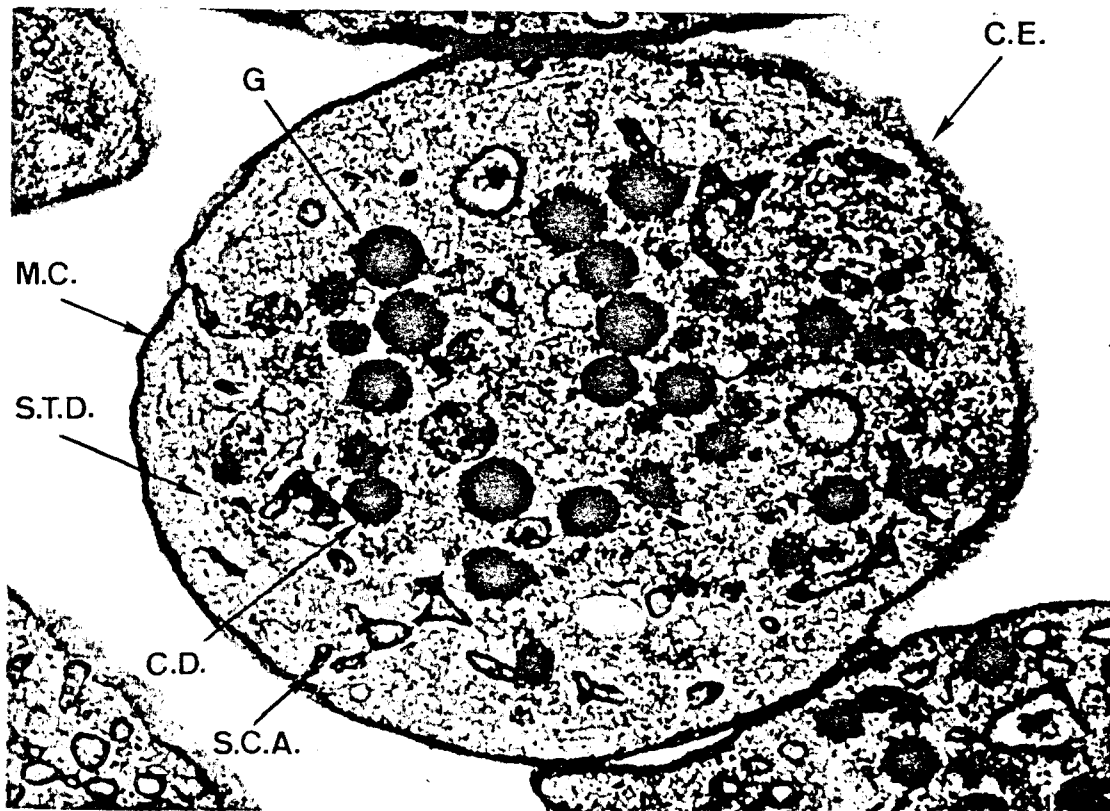


Figura 2. Estructura plaquetar per microscopia electrònica

enzimàtica: un dels components més importants és la **bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa**, que ajuda a mantenir els gradients iònics transmembrana. També trobem a la membrana citoplasmàtica les **fosfolipasses A i C** que controlen els nivells de calci intracel.lular i l'alliberació d'àcid araquidònic. La membrana citoplasmica

s'invagina profusament a l'interior de la plaqueta formant el sistema canalicular obert. La capa interna de la membrana, la **regió submembranosa**, és el tercer element de la zona perifèrica i la seva funció essencial és la transducció de senyals des del medi extern a l'interior de les plaquetes <sup>[33]</sup>. El component majoritari és una proteïna amb afinitat per l'actina (*ABP actin-binding protein*) que intervé en la polimerització de l'actina i col·labora així en els canvis morfològics que succeeixen durant l'activació plaquetària.

El segon component anatòmic de les plaquetes és la denominada **zona sol-gel, també coneguda per citosquelet**. Dins de la matriu plaquetària es troben microtúbuls, microfilaments i filaments submembranosos. Els més abundants dels tres són els microtúbuls, que formen la banda circumferencial <sup>[33]</sup>. En la plaqueta estimulada, la contracció d'aquesta banda sembla ser la responsable dels moviments centrípets i de la reorganització de les organel·les, que faciliten l'emissió de pseudòpodes i el procés de secreció. Els microfilaments estan intercalats en el citoplasma de les plaquetes i estan compostos d'actina, miosina, actomiosina, troponina i tropomiosina. Poden passar d'un estat gelatinós no organitzat a filaments paral·lels capaços de contraure's en segons, per fer que la plaqueta canviï de forma <sup>[35]</sup>. En aquesta zona, també trobem acúmuls de glicogen distribuïts de manera aleatòria.

El tercer component anatòmic de les plaquetes és el format per les **organel·les plaquetàries**: els grànuls  $\alpha$ , els grànuls densos, els lisosomes, els peroxisomes i les mitocòndries, que es reparteixen de forma homogènia dins del citoplasma plaquetari. Els **grànuls  $\alpha$**  són els més nombrosos (de 20 a 200 per plaqueta) i contenen fonamentalment proteïnes. El paper fisiològic d'aquestes proteïnes no està totalment aclarit, però és sabut que el factor plaquetari 4 neutralitza l'efecte anticoagulant de l'heparina. El nombre de **grànuls densos** és menor (de 2 a 10 per plaqueta) i al microscopi electrònic de transmissió, s'observen com a grànuls intensament opacs. D'entre els seus components cal ressaltar, per la seva

importància en la fisiologia plaquetària, l'ADP. També contenen concentracions elevades d'amines, sobretot serotonina, i altres nucleòtids i cations divalents (calci i magnesi). Els **lisosomes** contenen hidrolases àcides: enzims de baix pH, la funció dels quals és digerir productes fagocitats per la plaqueta.

GRÀNULS  $\alpha$

Fibrinogen  
 Factor V  
 Factor von Willebrand  
 Fibronectina  
 Factor plaquetari 4  
 $\beta$ -tromboglobulina  
 Trombospondina  
 Albúmina  
 Factors de creixement: factor mitogènic plaquetari  
 Inhibidor de l'activador del plasminogen tipus I (PAI-1)

GRÀNULS DENSOS

ADP  
 ATP  
 GDP  
 GTP  
 Calci, Magnesi  
 Serotonina

Taula 2.- Contingut dels grànuls plaquetaris

Les substàncies emmagatzemades en els grànuls  $\alpha$  i densos juguen un important paper en el funcionalisme plaquetari. En el decurs dels fenòmens que esdevenen després de l'activació, el contingut d'aquests grànuls és alliberat; tot això contribueix a l'amplificació de la resposta plaquetària, ja que la majoria de les substàncies contingudes estan relacionades amb els fenòmens d'agregació.

Els **sistemes de membrana** tenen una especial importància en l'anatomia plaquetària. El **sistema canalicular obert (SCO)**, com ja hem dit, està format per invaginacions de la membrana que, després de l'activació plaquetària s'exterioritza i permet a la plaqueta d'extendre's sobre la superfície a la qual s'ha adherit i d'augmentar considerablement l'àrea que és capaç de cobrir <sup>[37]</sup>. Aquest sistema de canals també proporciona una via per la sortida a l'exterior de substàncies alliberades en el decurs de l'activació, així com una via d'aclariment de receptors <sup>[37]</sup>. El **sistema tubular dens (STD)** deriva del reticle endoplàsmic lliu; és el lloc de dipòsit del **calci intraplaquetari** <sup>[39]</sup>, element fonamental per les reaccions de contracció plaquetària i on es localitzen els **enzims relacionats amb**

la síntesi de prostaglandines <sup>[40]</sup>. En el STD trobem també la bomba de calci  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPasa, que disminueix els nivells elevats de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmàtic i l'adenilciclasa que sintetitza AMPc, important inhibidor plaquetari. En el STD també resideix la capacitat enzimàtica per l'alliberació de l'AA dels fosfolípids de la membrana: les fosfolipases  $\text{A}_2$  i C. Els dos sistemes de membranes (SCO i STD) es troben freqüentment en íntim contacte, formant els anomenats complexos de membrana. És relativament fàcil establir un paral·lelisme d'aquest sistema de membranes amb el que és present a la cèl·lula muscular llisa: el SCO seria equivalent als canals transversos musculars i el STD recorda els sarcotúbuls de la cèl·lula muscular. Això i la presència d'elements contràctils a la plaqueta han donat peu a considerar aquesta com un model experimental de cèl·lula muscular llisa <sup>[43]</sup>.

### **1.2.2.- FISIOLOGIA**

Després d'una lesió vascular amb exposició de les capes subendotelials, les plaquetes s'adhereixen a la superfície lesionada. Després de l'adhesió, les plaquetes canvien la seva forma de discos llisos a esferes amb pseudòpods, gràcies als quals es fixen sobre la lesió. A continuació les plaquetes s'extenen, alliberen el contingut dels seus grànuls i comencen a agregar-se entre elles per formar el trombus plaquetari <sup>[36]</sup>.

#### **1.2.2.1.- Adhesió plaquetària**

Quan el recobriment de cèl·lules endotelials desapareix dels vasos, diferents proteïnes presents en el subendoteli resulten exposades a les plaquetes circulants. Les proteïnes que intervenen i fan de mitjanceres en la interacció plaqueta-vas, es coneixen com a **proteïnes adhesives**: són la fibronectina, la laminina, la vitronectina <sup>[44]</sup> i la més important d'elles, el factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand, fixant-se a la glicoproteïna GPIb, és el que inicia l'adhesió de

les plaquetes al subendoteli; a més, en quedar unit als components del subendoteli, canvia de conformació i es fa reactiu per la plaqueta, i és capaç de desencadenar també els mecanismes d'activació.

#### 1.2.2.2.- Activació plaquetària

De forma concomitant a l'adhesió, s'inicien els processos d'activació plaquetària. Diferents agents participen en aquest procés interaccionant a través de **receptors específics** presents en la membrana citoplasmàtica, principalment la trombina, el col·lagen, l'ADP, l'epinefrina, la serotonina i el tromboxà A<sub>2</sub>. Malgrat que cada un d'ells poseeix un receptor específic, la seqüència de processos que es segueixen en la majoria d'ells són similars. El receptor, després de la unió amb l'agonista, interacciona amb una o varies proteïnes en la membrana, que requereixen GTP i que es coneixen com a proteïnes reguladores fixadores de nucleòtid de guanina o **proteïnes G**. Les proteïnes G interaccionen aleshores amb enzims o canals iònics de la membrana citoplasmàtica i **estimulen la producció de segons missatgers i també podden modular el flux d'ions a través de la membrana** [46]. Aquest fet dóna lloc, entre altres reaccions, a canvis en la forma discoïdal de la plaqueta (*shape change* o contracció plaquetària) que passa a ser esfèrica, centralitza els grànuls i emet simultàniament pseudòpods que afavoreixen: 1. la cobertura de la zona del vas lesionat i 2. la col·lisió interplaquetària, fonamental perquè es produeixi l'agregació [23].

En la plaqueta, després de l'estimulació, el primer senyal que es detecta és **l'activació de la fosfolipasa C (PLC)**, mediada per una proteïna G lligada al receptor, que allibera **inositol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG) dels fosfolípids de membrana**. L'IP3, hidrosoluble, travessa el citoplasma i intervé en l'augment en la concentració de calci intracitoplasmàtic, considerat el factor regulador de diversos processos plaquetaris com ara la mobilització de l'àcid araquidònic a partir dels fosfolípids de la membrana i la fosforilació de la cadena

lleugera de la miosina, lligada als fenòmens de contracció i d'alliberació. El DAG, liposoluble, es manté unit a la membrana i activa la proteïnquinasa C (PKC) que fosforila una altra proteïna la qual actua sinèrgicament amb el calci en l'alliberació dels grànuls [32]. El DAG també pot ser convertit en àcid fosfatídic, que pot ser utilitzat per la resíntesi d'IP3 o ser hidrolitzat a àcid araquidònic.

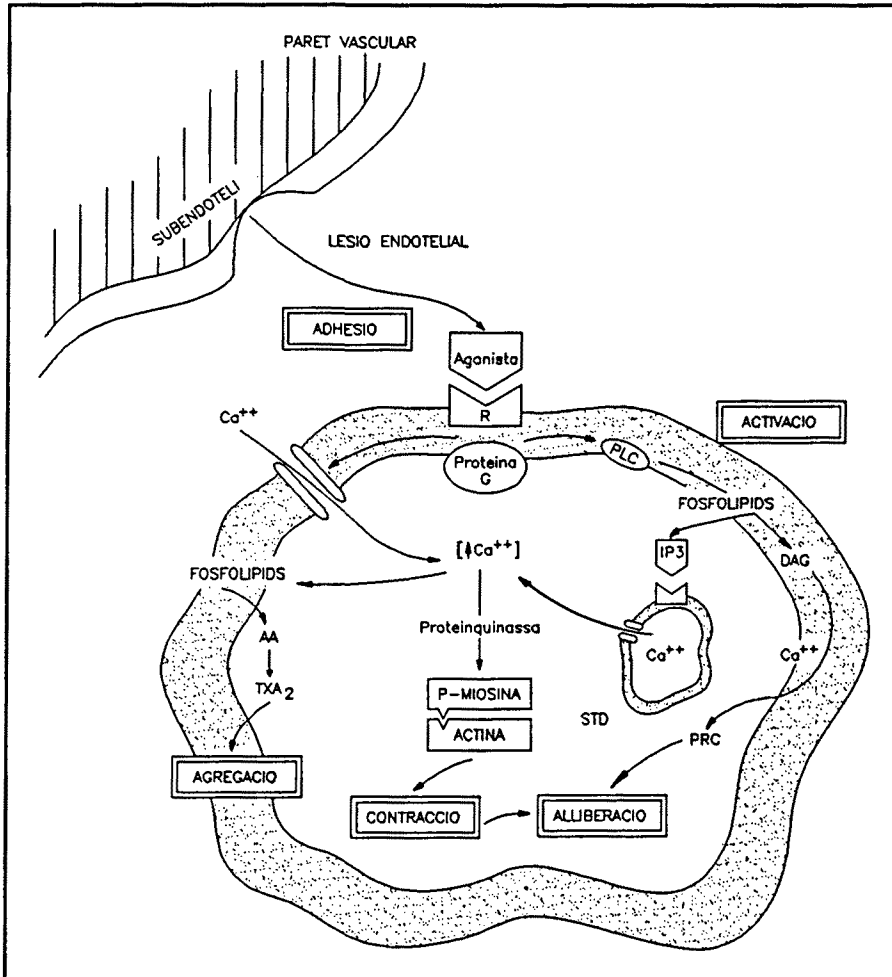


Figura 4. Fisiologia plaquetària

D'altra banda, l'activació d'una altra fosfolipasa pel  $Ca^{2+}$ , la **fosfolipasa A<sub>2</sub>** (**PLA<sub>2</sub>**) catalitza la conversió de fosfatidilcolina a àcid araquidònic.

La PLA<sub>2</sub> i la PLC han estat trobades tant en la membrana citoplasmàtica com en les altres membranes. Malgrat aquesta dispersió, ambdós enzims estan en estret contacte amb l'AA, distribuït de forma asimètrica en la membrana i susceptible de ser hidrolitzat.

### 1.2.2.3.- Alliberació plaquetària

Un cop activades les plaquetes, es produeixen dos tipus d'alliberació plaquetària: l'alliberació del contingut dels grànuls secretors (**exocitosi o desgranulació**) i l'alliberació de metabòlits sintetitzats i secretats només quan la plaqueta s'activa. Un exemple d'aquest segon tipus és l'alliberament de l'àcid araquidònic (AA) que, un cop lliure, és utilitzat per sintetitzar TXA<sub>2</sub>, procés on intervenen la ciclooxigenasa i la tromboxàsintetasa <sup>[46]</sup>. El TXA<sub>2</sub> que actua a través de receptors específics, és l'agent proagregant més potent que es coneix; a més, quan actua sobre el múscul llis arterial provoca una vasoconstricció local, que afavoreix l'aturada del sagnat.

Així doncs, la contracció plaquetària, amb el canvi de forma i la secreció del contingut dels grànuls, són processos complexos **calci-dependents** i **controlats per la concentració d'AMPc** intraplaquetari <sup>[23]</sup>.

### 1.2.2.4.- Agregació plaquetària

L'agregació plaquetària constitueix l'última fase en la successió de processos desencadenats per l'activació. Consisteix en la **unió irreversible de les plaquetes entre si** utilitzant principalment la molècula de fibrinogen com a anclatge entre elles.

En la plaqueta en repòs, el receptor pel fibrinogen, el complex calci-dependent format per les glicoproteïnes GPIIb-IIIa, té una estructura tal que és impossible

la unió fibrinogen-complex GPIIb-IIIa. Després de l'activació, es produeix un canvi en la conformació del complex GPIIb-IIIa que deixa al descobert un lloc de fixació pel fibrinogen. Els mecanismes bioquímics que condueixen a l'activació de la GPIIb-IIIa no es coneixen completament. Hi ha evidències experimentals que indiquen l'existència de diferents vies d'activació. Una d'elles seria a través de la fosfolipasa C i la proteïnquinasa C <sup>[47]</sup>, i una altra mediada directament per les proteïnes G integrants de les membranes citoplasmàtiques (proteïnes G), que es troben acoblades als receptors dels diversos agonistes.

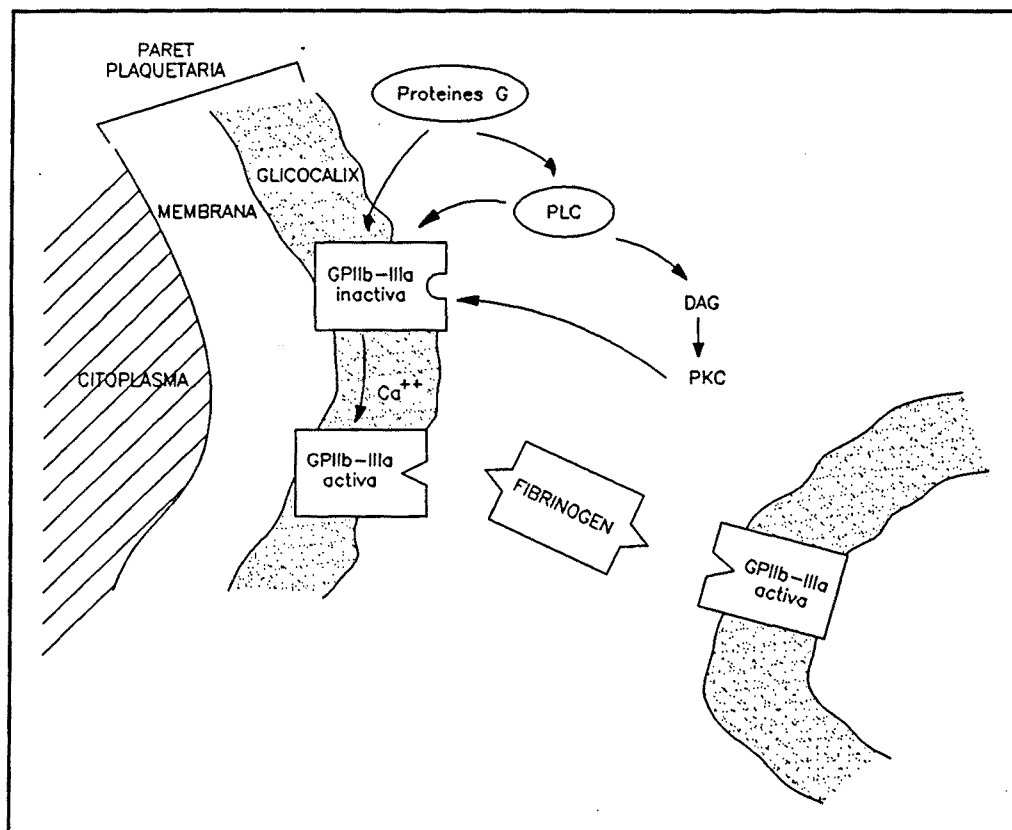


Figura 5. Agregació plaquetària

Si bé inicialment l'agregat és lax, fenòmens de contracció a nivell del citosquelet de les plaquetes fan que, als tres minuts del començament de la seva formació, el



trombus plaquetari estigui format per una massa compacta de plaquetes interdigitades i desgranulades.

Hí ha una llarga sèrie de factors que regulen els complexos fenòmens que succeeixen durant l'activació i agregació plaquetàries. Per una banda, tenim els **factors físics**: la col·lisió plaqueta-plaqueta és imprescindible per desencadenar l'agregació plaquetària. L'agregació, com a fenomen dinàmic, no es produirà en un sistema estàtic. Durant el flux sanguini, els glòbuls rojos, amb el seu paper reològic, afavoreixen els impactes de les plaquetes amb els elements exposats del subendoteli i, a la vegada, la col·lisió plaqueta-plaqueta. Per altra banda, tenim els

**factors bioquímics**, entre els quals cal destacar el calci, l'increment del qual a nivell intracitoplasmàtic desencadena els processos d'alliberació i agregació, i els diversos agents agregants plaquetaris que referim a continuació

#### 1.2.2.5.- Principals agents agregants

- Adenosin difosfat (ADP)

Tot seguit a la lesió endotelial s'indueix, a part de l'exposició d'elements subendotelials, l'**alliberació local d'ADP**. Aquest ADP local actua sobre les plaquetes properes, possiblement activant el **flux de calci** des de la membrana cap al citoplasma, i produeix la seva contracció amb la conseqüent alliberació de major quantitat d'ADP, emmagatzemat en els grànuls densos, cap al medi extracel·lular <sup>[40,48]</sup>. Aquest ADP lliure, actuant sobre els receptors de superfície de la membrana cel·lular de les plaquetes circulants, indueix nou flux de calci, activació de les fosfolipases de membrana i major alliberació d'ADP, amb la qual cosa el procés queda perpetuat <sup>[35]</sup>.

■ Trombina

La trombina estimula l'agregació plaquetària a través d'un receptor específic que poseeixen les plaquetes <sup>[49]</sup>. Procedeix de l'activació de la cascada de la coagulació, a partir de l'exposició en l'àrea lesionada de col·lagen, que és capaç d'activar els factors XII i XI (sistema intrínsec) a la vegada que provoca l'adhesió plaquetària. La trombina que es forma en l'entorn periplaquetari indueix també l'agregació a través de la interacció, bé amb receptors específics que fomentaran a la vegada els mecanismes d'alliberació d'ADP i la síntesi de TXA<sub>2</sub>, bé per alguna altra via desconeguda <sup>[50,51]</sup>. Quan la plaqueta ha estat activada, es produeixen canvis en la seva membrana que afavoreixen la disponibilitat del factor plaquetari 3, suport de les reaccions bioquímiques en l'activació de la coagulació. En resum, **la trombina activa els mecanismes que regeixen l'agregació de les plaquetes, és a dir, mobilització de calci, formació de TXA<sub>2</sub> i exposició de la forma activa del receptor glicoproteic GPIIb-IIIa. A més a més, intervé en l'estabilització i fixació del trombus plaquetari, en actuar sobre el fibrinogen periplaquetari, produint polímers de fibrina que s'adhereixen a la superfície plaquetària.**

■ Àcid araquidònic (AA)

L'àcid araquidònic és l'àcid gras insaturat majoritari de les plaquetes, que es troba a la majoria dels fosfolípids de la membrana plaquetària, particularment la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina i el fosfatidilinositol, que representen el 38, 31 i el 4% del total de fosfolípids respectivament. En les plaquetes humanes existeix una marcada diferència entre la composició dels fosfolípids del sistema tubular dens i els de la membrana plasmàtica. En el sistema tubular dens s'ha trobat una gran quantitat de fosfatidilcolina <sup>[53]</sup>, mentre que a la membrana plasmàtica s'ha observat una distribució asimètrica dels fosfolípids entre les dues cares. La cara externa està essencialment constituïda per fosfatidilcolina i esfingomielina mentre que la cara interna conté principalment fosfatidiletanolamina

i fosfatidilinositol. Aquesta asimetria en els fosfolípids causa una **localització predominant de l'araquidonat a la part interna de la plaqueta**. Aquesta distribució asimètrica pot ser important ja que facilita l'accés de les fosfolipases al seu substrat dins de la cèl·lula per alliberar l'AA. L'araquidonat present en els fosfolípids de membrana és alliberat per l'acció de les fosfolipases. L'àcid araquidònic alliberat actua com a agent agregant a través dels seus metabòlits, les prostaglandines. Les característiques, acció i regulació de les fosfolipases i dels metabòlits de l'àcid araquidònic són descrits en el següent capítol.

#### 1.2.2.6.- Metabolisme de l'àcid araquidònic. Biosíntesi de les prostaglandines

Com ja hem descrit anteriorment, l'àcid araquidònic és l'àcid gras insaturat més abundant en els fosfolípids de la membrana plaquetària, on es troba esterificat. En descriure ara la formació de les prostaglandines relacionades amb les plaquetes, parlarem estrictament del metabolisme d'aquest àcid, encara que actualment coneixem també la importància hemostàtica que poseeixen les sèries de prostaglandines derivades d'altres àcids insaturats <sup>[54]</sup>.

##### ■ Alliberació de l'àcid araquidònic

La biosíntesi de prostaglandines en les plaquetes a partir de l'àcid araquidònic, comença amb l'alliberació d'aquest dels fosfolípids de la membrana. Aquesta alliberació tindria lloc per acció de les fosfolipases de la membrana plaquetària, de les quals es coneixen dues d'elles: la **fosfolipasa C (PLC)** i la **fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**. Ambdues estan unides a la part interna de la membrana cel·lular a través de proteïnes G. La PLC hidrolitza preferentment l'AA del fosfatidilinositol i la PLA<sub>2</sub>, que es troba també lligada a la membrana, actua preferentment sobre la fosfatidilcolina i la fosfatidiletanolamina <sup>[55]</sup>. Alguns estudis en plaquetes humanes estimulades amb trombina o col·lagen han demostrat que la PLA<sub>2</sub> juga un paper

quantitativament més important que el de la PLC en l'alliberació de l'AA, és a dir, que la generació de TXA<sub>2</sub> depèn primordialment de l'acció de la PLA<sub>2</sub> [56].

Donat que l'AA no es troba lliure a les plaquetes, i que un cop alliberat, és ràpidament metabolitzat, sembla ser que les fosfolipases constitueixen el principal mecanisme de control del metabolisme d'aquest àcid gras. A la plaqueta, el col·lagen, la trombina, l'ADP, l'epinefrina i alguns cations estimulen l'activitat de les fosfolipases, amb la consegüent alliberació d'AA. El calci és un factor essencial en l'activació de les PLC i PLA<sub>2</sub>. A continuació, describim alguns dels mecanismes que intervenen en la regulació de les fosfolipases:

**CALCI:** en general, existia el concepte que l'activitat de les fosfolipases depenia de la disponibilitat de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma. Tanmateix, darrerament s'ha pogut comprovar que la PLC pot activar-se a concentracions basals de Ca<sup>2+</sup> mentre que la PLA<sub>2</sub> requereix concentracions no fisiològiques de Ca<sup>2+</sup> per arribar a la seva màxima activitat *in vitro* i per altra banda, un increment dels nivells de Ca<sup>2+</sup> citoplasmàtic no implica necessàriament l'activació de la PLA<sub>2</sub>. Per això es suggereix l'existència de mecanismes addicionals Ca<sup>2+</sup>-independents que intervindrien en la regulació de l'activitat d'aquests enzims.

**G-PROTEÏNES:** Les G-proteïnes, una família de proteïnes d'unió de nucleòtids de guanina, funcionen com a receptors per la transducció de senyals de diversos tipus de cèl·lules. La seva presència ha estat ben demostrada en la plaqueta. Tanmateix, existeixen evidències recents que l'estimulació de la hidròlisi del fosfatidilinositol per part d'un agonista de les plaquetes, ve catalitzada per una PLC unida a la membrana associada a una G-proteïna denominada Gp. Aquesta Gp fa de mitjancera en l'activació de la plaqueta per la trombina, el col·lagen, el PAF, la PGG<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, la vasopressina i l'epinefrina [32]. També en el cas de la PLA<sub>2</sub> sembla existir un sistema de regulació similar [63]. Aquestes troballes indiquen l'acoblament d'unes G-proteïnes per l'activació de la PLC o PLA<sub>2</sub> a través del receptor, però es desconeix quina subunitat de la G-proteïna interacciona realment amb l'enzim.

**PH:** L'estimulació de diversos tipus de cèl·lules és el resultat de l'increment del pH citoplasmàtic a través del sistema de transport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de membrana. S'especula que també

en la plaqueta el canvi de pH induït per la trombina, l'epinefrina o el col·lagen, potenciarà la mobilització del  $\text{Ca}^{2+}$  modulant indirectament l'activitat de la  $\text{PLA}_2$ . Això explicaria el fet que la  $\text{PLA}_2$  exhibeixi una activitat màxima a pH alcalí.

**FACTORS MODULADORS ENDÒGENS:** S'han descrit en diferents tipus de cèl·lules, substàncies endògenes d'estructura proteica o lipídica que semblen modular les fosfolipases. Unes de les més importants, les lipocortines, són proteïnes àmpliament distribuïdes en teixits i cèl·lules. El significat fisiològic de les lipocortines en la regulació de les fosfolipases intracel·lulars és controvertit. Podrien limitar l'accés de l'enzim als lípids de membrana per la seva capacitat d'unir-se als fosfolípids sense actuar a nivell de l'enzim.

#### ■ Metabolisme dels eicosanoids per la via de la ciclooxygenasa

Per la via metabòlica de la ciclooxygenasa, l'AA és convertit en els denominats endoperòxids intermitjos: PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub>, compostos molt inestables la producció dels quals s'acompanya de consum d'oxigen i que poden fragmentar-se espontàniament en àcid 12 L-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoic (que és quimiotàctic pels neutròfils) amb alliberació simultània de malonildialdehid <sup>[64]</sup>. Els endoperòxids intermitjos també poden patir alteracions no enzimàtiques, convertint-se en les prostaglandines estables PGE, PGF i PGD. Les prostaglandines primàries, aquelles que es troben en la majoria de les cèl·lules són, entre d'altres, la PGE<sub>1</sub>, la PGE<sub>2</sub>, la PGF<sub>1</sub>α i la PGF<sub>2</sub>α. En les plaquetes, els endoperòxids intermitjos són metabolitzats per la tromboxàsintetasa que els converteix en tromboxà A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), molt inestable, de vida mitjana molt curta (5 minuts a plasma), d'efecte vasoconstrictor i el més potent agregant conegut fins avui. A més, el TXA<sub>2</sub> també podria facilitar l'augment de la concentració de calci intracitoplasmàtic <sup>[23]</sup>. Per hidròlisi, el TXA<sub>2</sub> es transforma en el compost estable tromboxà B<sub>2</sub>, sense acció biològica coneguda <sup>[65]</sup>. En la cèl·lula endotelial, el metabolisme de l'AA per la via de la ciclooxygenasa és similar però dona com a resultat la prostaciclina o PGI<sub>2</sub>, descrita inicialment per Moncada <sup>[66]</sup>, d'efecte antiagregant plaquetari i vasodilatador i per tant, d'acció contrària a la del

TXA<sub>2</sub> [67]. La transformació en uns compostos o altres, depèn del lloc on es formen, de la quantitat relativa dels enzims responsables de la seva síntesi i degradació i de la disponibilitat dels substractes [68]. En situació fisiològica sembla existir un equilibri entre la producció de PGI<sub>2</sub> per part de la paret vascular i de TXA<sub>2</sub> per part de la plaqueta [69].

La PGE<sub>1</sub>, sintetitzada per la majoria de les cèl·lules, actua sobre el **mateix receptor plaquetari que la prostaciclina**, activant la producció d'AMPC i per tant doncs, inhibint l'agregació plaquetària. Donat que aquesta producció d'AMPC és quantitativament menor que quan és la PGI<sub>2</sub> la que actua, podem considerar la PGE<sub>1</sub> un **agonista dèbil** d'aquest receptor. El receptor de la PGI<sub>2</sub> i la PGE<sub>1</sub> té dues subunitats reguladores: l'activadora i la inhibidora. Mentre que la PGI<sub>2</sub> i la PGE<sub>1</sub> tenen una afinitat similar per la subunitat activadora, la PGE<sub>1</sub> té una major afinitat (que la PGI<sub>2</sub>) per la subunitat inhibidora; el resultant en conjunt és una menor producció d'AMPC [13]. En resum doncs, la PGE<sub>1</sub> pot ser considerada un anàleg de la PGI<sub>2</sub>, menys potent però més estable. En aquesta tesi, aquesta propietat ha estat utilitzada per estudiar les modificacions en la gestació normal i patològica en la sensibilitat a un agent inhibidor del comportament plaquetari, en aquest cas a la PGE<sub>1</sub>.

L'AMPC augmenta l'activitat de la bomba de calci, disminuint la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. A més és un inhibidor d'ambdues fosfolipases [61,62] i de la ciclooxigenasa. D'aquesta manera controla la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, inhibint l'activitat plaquetària. Això explica perquè els agents estimulants de l'adenilciclasa plaquetària (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub>), en incrementar els nivells d'AMPC, actuen com a inhibidors plaquetaris [41]. A més, l'adenilciclasa plaquetària utilitza com a substrate l'ADP, convertint-lo en AMPC. El consum d'ADP disminueix un dels principals substractes disponibles desencadenants de l'agregació plaquetària.

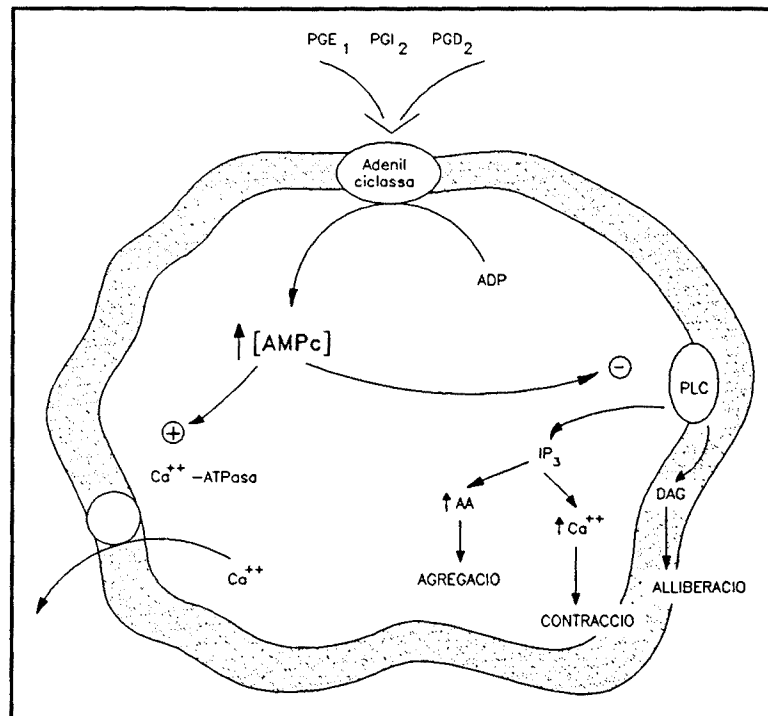


Figura 3. Mecanismes d'actuació de l'AMPc

■ Metabolisme dels eicosanoids per la via de la lipooxigenasa

Per la via de la lipooxigenasa, l'AA és metabolitzat a àcid 12 L-hidroperoxi-5,8,10,14-eicosatetraenoic (HPETE) que és reduït donant lloc a l'àcid 12 L-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenoic (HETE), d'acció quimiotàctica pels leucòcits. Estudis més recents suggereixen que, a més, el 12-HETE podria augmentar la **capacitat adhesiva** de les plaquetes, i fins i tot potser facilitar l'expressió de determinades estructures existents a la seva membrana [70,71]. Els metabòlits produïts per aquesta via i els seus efectes segueixen essent objecte d'estudi. En la **cèl·lula endotelial**, aquesta via dóna lloc a l'àcid 13-hidroxi-octadecadienoic

(13-HODE) [72]. Alguns autors han suggerit que aquest compost podria augmentar la **tromboresistència** de la cèl·lula endotelial, possiblement regulant l'expressió de determinades estructures adhesives presents a la membrana cel·lular [71].

Veiem doncs com l'adhesió i agregació plaquetàries semblen estar regulades o modulades per diferents substàncies, en part desconegudes, que tendrien a mantenir un equilibri, existint a la vegada una trombogenicitat de les plaquetes i una tromboresistència de les cèl·lules de l'endoteli vascular. Aquest equilibri possibilitaria el correcte funcionament de l'hemostàsia primària.

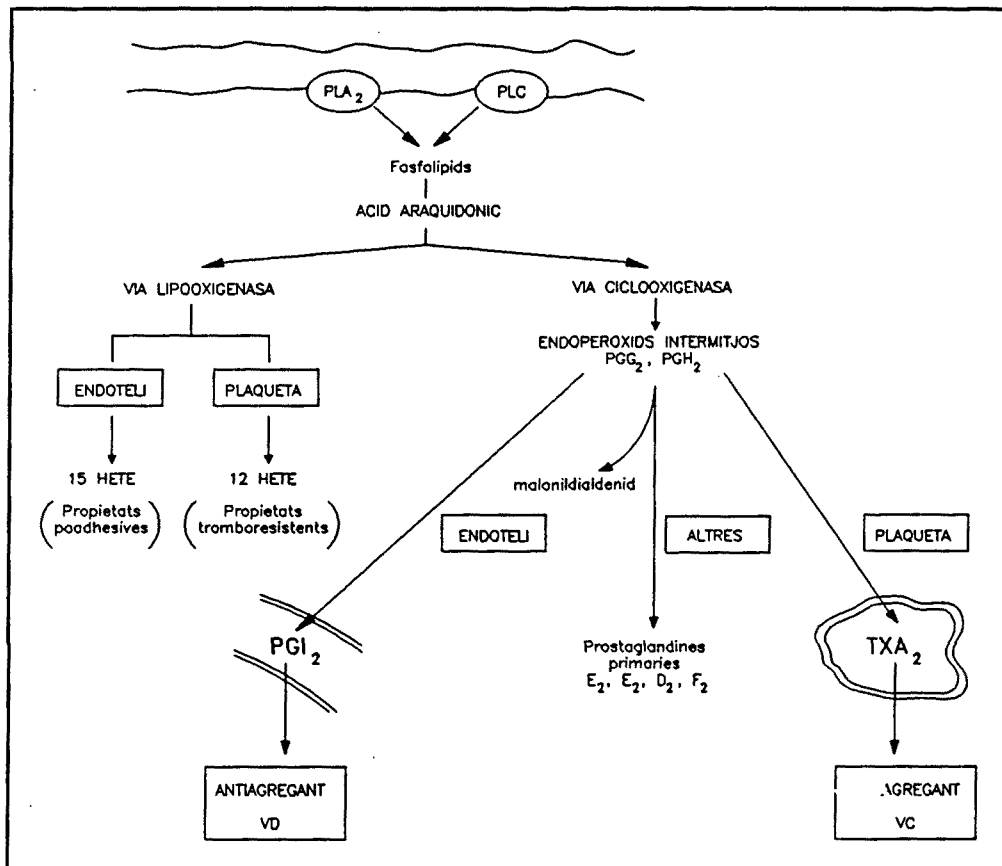


Figura 6. Metabolisme de l'àcid araquidònic



### 1.2.3.- LA PLAQUETA COM A MODEL DE CÈL·LULA MUSCULAR LLISA VASCULAR

Tot i que les plaquetes són fragments de citoplasma dels megacariòcits, poseeixen una estructura complexa que els hi és necessària per les moltes i importants funcions que tenen en l'hemostàsia primària <sup>[73]</sup>.

Com ja hem descrit a l'apartat de l'estructura plaquetària, adjacent a la superfície de la membrana plasmàtica i potser anclats en ella, es troben els **microfilaments** que estan compostos principalment per actina i miosina juntament amb una banda circumferencial de microtúbuls, compostos de tubulina. Diferents estudis han demostrat que els microfilaments tenen una estructura i una organització essencialment igual a la de la musculatura llisa vascular, en el sentit que aquests filaments s'engalzen d'acord a un mateix principi. Així, la formació de ponts d'actina-miosina, que són els que generen la força contràctil, es produeix, a l'igual que en la fibra muscular llisa vascular, per un procés de fosforilació en la cadena lleugera de la miosina, regulat per la quinasa específica, MLCK (de l'anglès *myosin light chain kinase*) que és dependent de la unió  $Ca^{2+}$ -calmodulina <sup>[73]</sup>. Així mateix, el sistema canalicular obert és comparable als canals transversos musculars i el sistema tubular dens seria comparable al reticle sarcoplàsmic de la cèl·lula muscular contràctil.

S'ha demostrat l'existència d'una sèrie de receptors de membrana a les plaquetes, alguns dels quals coincideixen amb els de la cèl·lula muscular llisa vascular. Entre d'altres, en les plaquetes s'han detectat receptors de: col·lagen, trombina, ADP, angiotensina II, V1 de vasopressina (tipus vascular), epinefrina, i fibrinogen. En el cas de la trombina, aquesta interacciona amb les plaquetes per dos llocs específics. El primer és per la unió amb la GPIb de forma similar a una hormona, comportant-se com un clàssic receptor d'alta afinitat. El segon és una degradació

proteolítica (la trombina és una proteassa de serina) de la GP V. La unió de la trombina a plaquetes intactes és ràpida, saturable i reversible <sup>[74]</sup>.

Com ja hem explicat a capítols anteriors, els **mecanismes moleculars intracel·lulars** que es posen en marxa en el moment de l'activació plaquetària són similars als d'altres cèl·lules. El senyal emès des del receptor de membrana activat és traduït a través de la membrana plasmàtica per proteïnes lligadores de GTP o proteïnes G. Aquests mecanismes estimulen i regulen sistemes efectors específics, com la hidròlisi de fosfolípids d'inositol induïda per la PLC, i canals iònics <sup>[73]</sup>. Els sistemes efectors modulen els nivells dels missatgers intracel·lulars tals com l'IP3-Ca<sup>2+</sup> intracel·lular i el DAG-PKC, que després posaran en marxa la resposta fisiològica a través de canvis en la fosforilació de diverses proteïnes, l'activitat enzimàtica i les propietats estructurals de certes proteïnes.

Les plaquetes han rebut una gran atenció en l'estudi de la regulació del calci intracel·lular en la HTA essencial i per extensió en els trastorns hipertensius de l'embaràs degut a que com s'ha dit, comparteixen un gran nombre de característiques amb la fibra muscular llisa <sup>[75]</sup>. A més de les **similituds estructurals** en quant a miofibril·les, **sistemes de dipòsit intracel·lular i receptors de membrana**, com ja s'ha comentat abans, ambdues cèl·lules s'activen per un augment de la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular que es manifesta amb la contracció muscular i l'agregació i contracció plaquetàries. Tots dos tipus de cèl·lules són molt riques en fibres contràctils similars. **Utilitzen també els mateixos segons missatgers**, el Ca<sup>2+</sup> per l'activació <sup>[76]</sup> i l'AMPc per la inhibició <sup>[77]</sup>.

El nombre de fenòmens en els quals el calci intracel·lular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) és el senyal per a l'activació cel·lular, és molt llarg, incloent-hi el moviment cel·lular, la secreció, la divisió, el metabolisme intermediari, la permeabilitat de membrana i la contracció muscular entre altres. L'interès per l'estudi de la **regulació del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**,

en la gestació normal i en els trastorns hipertensius de l'embaràs ve donat pel fet que el  $[Ca^{2+}]_i$  és fonamental pels processos: 1) d'agregació plaquetària i 2) de contracció de la musculatura llisa vascular. Ambdós processos són una constant en els trastorns hipertensius de l'embaràs i donat que considerem la plaqueta un model experimental de fibra muscular llisa vascular, estudiant els canvis del  $[Ca^{2+}]_i$  podem estudiar el que està succeïnt en aquests dos nivells (plaqueta i paret vascular), que estan interrelacionats d'una manera tant estreta.

L'interès de l'estudi de la regulació del  $[Ca^{2+}]_i$  en la gestació normal i en els trastorns hipertensius de l'embaràs, ve donat pel fet que l'activació plaquetària sembla ser un fet reiteradament referit a la literatura, tant en la gestació normal com en la patològica i perquè en el cas dels trastorns hipertensius de l'embaràs es dóna un augment de les resistències vasculars perifèriques ben diferent del que succeeix en la gestació normal. El  $[Ca^{2+}]_i$  és fonamental en aquests processos d'activació i agregació plaquetària (que en el fons i tal com hem explicat abans, no és més que una contracció plaquetària) i en la contracció de la musculatura llisa vascular. Per tant, el coneixement del seu metabolisme ens ha de permetre entendre millor tant el procés fisiològic de la gestació, com la fisiopatologia dels trastorns hipertensius de l'embaràs.

En els darrers anys, gràcies al desenvolupament de tecnologies que permeten mesurar l'activitat del  $Ca^{2+}$  dins de la cèl·lula, s'ha pogut avançar en el coneixement de la regulació del  $Ca^{2+}$  intracel·lular <sup>[78]</sup>.

La **contracció muscular** depèn de la interacció entre les fibril·les intracel·lulars actina i miosina. La miosina té dues cadenes pesades i dues lleugeres (**MLC**, de l'anglès *myosin light chain*). La subunitat reguladora de la contracció és una d'aquestes cadenes lleugeres. Aquesta regulació té lloc a través d'un procés de fosforilació i defosforilació per una quinasa específica que s'anomena **MLCK** (de l'anglès *myosin light chain kinase*). Quan aquesta subunitat es fosforila, s'activa un

altre enzim de l'actina, la qual cosa permet la formació de ponts actina-miosina amb la conseqüent contracció muscular. La **MLCK és calci-dependent** i per tant només s'activa quan s'uneix al  $\text{Ca}^{2+}$ . Així doncs, quan la cèl·lula és estimulada per un agonista, hi ha una augment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneix a la calmodulina (que actua com a receptor intracel·lular del  $\text{Ca}^{2+}$ ) i el complex calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  s'uneix a la MLCK inactiva, convertint-la en activa. Un cop activada, la MLCK fosforila la MLC, fenomen que condueix a la contracció muscular.

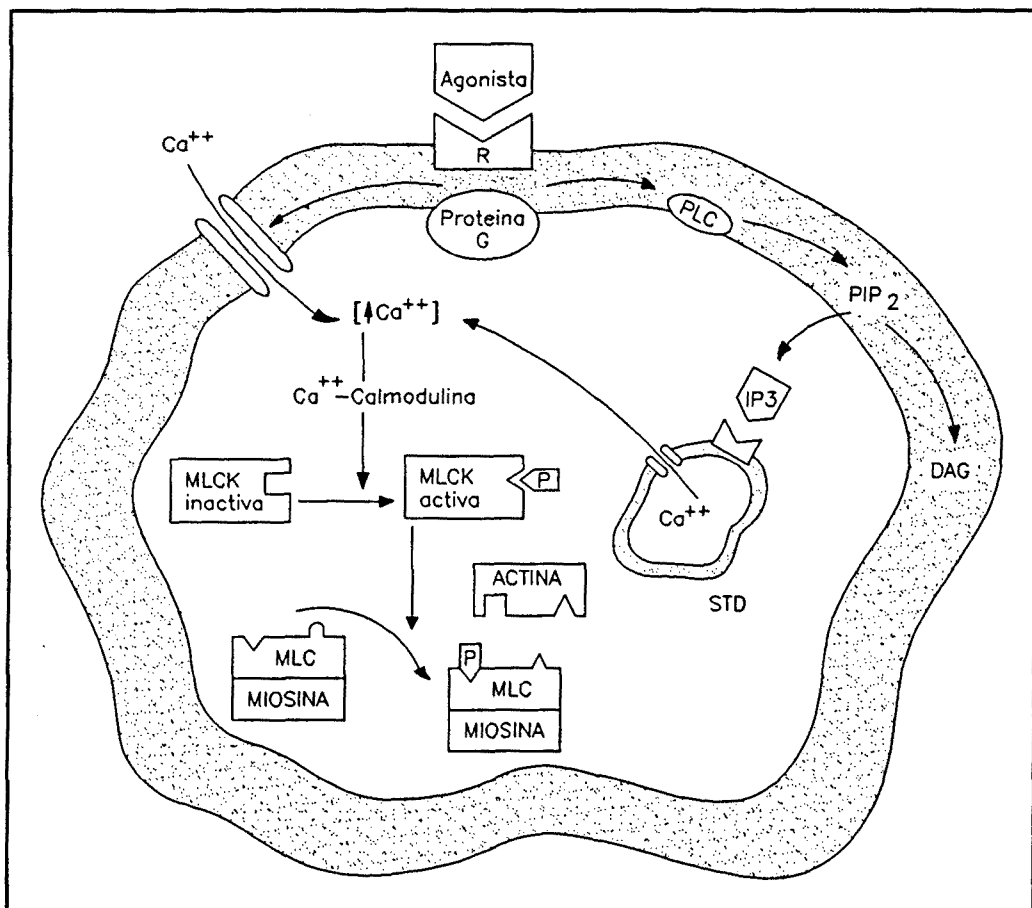


Figura 7. Contracció plaquetària

La funció del  $\text{Ca}^{2+}$  com a senyal intracel·lular requereix la seva modulació a concentracions de l'ordre submicromolar. Aquesta modulació s'aconsegueix per la formació de complexos  $\text{Ca}^{2+}$ -proteïnes ja siguin intracel·lulars o de membrana. Els nivells de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  són molt més baixos (aproximadament de 100nmol/L, essent molt variables <sup>[79]</sup>) que al medi extracel·lular (1 mmol/L), fent que hi hagi un gradient important transmembrana. El manteniment d'aquest gradient requereix la participació de transportadors actius de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmàtica i de les membranes dels diferents compartaments intracel·lulars.

### 1.2.3.1.- Mecanismes que regulen l'augment de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

- A través de la membrana cel·lular

Tenim l'evidència de l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a les cèl·lules estimulades amb agonistes per tres fets: a) hi ha captació de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular marcat radiactivament ( $^{45}\text{Ca}$ ), b) l'elevació en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  és molt més elevada en presència que en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular i c) l'elevació en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es produeix abans en presència que en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular <sup>[80,81]</sup>.

L'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cèl·lula pot tenir lloc principalment pels **canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge** (s'activen per la despolarització de la membrana plasmàtica) i pels **canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de receptor** (s'activen amb la unió de l'agonista amb el seu receptor de membrana). Altres vies d'entrada el paper biològic de les quals no és ben conegut, serien l'activada per l'estirament mecànic de la fibra muscular llisa <sup>[82]</sup> i la que es produeix de forma passiva anomenada  $\text{Ca}^{2+}$  leak <sup>[83]</sup>.

En la **plaqueta**, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana cel·lular es produeix principalment per un **canal de  $\text{Ca}^{2+}$  obert per un receptor** localitzat a la membrana plasmàtica. Es creu que el canal està acoblat al receptor directament o

a través d'una proteïna G <sup>[84]</sup>. Aquest mecanisme permet l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  molt poc temps després de la unió de l'agonista amb el receptor. És controvertit si a la plaqueta existeixen uns veritables canals dependents de voltatge, però està comprovat que els fàrmacs anomenats genèricament antagonistes del  $\text{Ca}^{2+}$ , que inhibeixen els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge, també inhibeixen l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en plaquetes humanes <sup>[85]</sup>, fins i tot a concentracions molt petites <sup>[86]</sup>.

A la cèl·lula muscular llisa vascular, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  té lloc primordialment pels dos mecanismes principals: els canals dependents de voltatge, que en el seu component de corrent ràpid són bloquejats pels antagonistes del calci, i el mediat per un receptor de membrana a través d'un canal activat per ATP.

Com hem vist, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cèl·lula es troba sotmesa a una regulació fisiològica, la qual cosa impedeix augmentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  excessius tant en quantitat com en duració. Així, **l'entrada demorada de  $\text{Ca}^{2+}$  es pot inhibir** per agents que augmenten els nivells intracel·lulars d'AMPc com és la forskolina <sup>[87]</sup> o pels nitrovasodilatadors, que indueixen elevacions del GMPc com són el nitroprussiat i l'òxid nítric. Tots ells produeixen els seus efectes per més d'un mecanisme com és la inhibició de la hidròlisi de fosfolípids de membrana i la fosforilació del propi canal de membrana <sup>[88]</sup>. **L'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  també es pot inhibir per augmentos de la proteïnquinasa C (PKC) <sup>[89]</sup>**, en part per inhibició de la hidròlisi de fosfoinositols de membrana, per un mecanisme de *feed-back* negatiu.

#### ■ Alliberament dels dipòsits intracel·lulars

La majoria de cèl·lules tenen diferents organel·les amb capacitat d'emmagatzemar  $\text{Ca}^{2+}$ . En les plaquetes, aquestes estructures vindrien representades pel sistema tubular dens, que en la cèl·lula muscular llisa vascular tenen el seu equivalent en el reticle sarcoplàsmic <sup>[88]</sup>. La demostració d'una elevació ràpida de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en plaquetes en resposta a un agonista en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular, va confirmar

la presència d'una alliberació intracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a l'agonista. El calci contingut als grànuls densos està en forma de pirofosfats i no és utilitzable com a catió.

Quan la cèl·lula és estimulada per un agonista, el  $\text{Ca}^{2+}$  és alliberat dels dipòsits intracel·lulars a través d'uns canals que s'obren al citoplasma, en presència de l'inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) <sup>[60]</sup>. L'augment d'IP3 citosòlic és transitori, de pocs segons, degut a que aquest compost és degradat ràpidament a altres inositols fosfats <sup>[90]</sup>. En les cèl·lules musculars llises, l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per l'IP3 augmenta quan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  és baixa i disminueix quan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  és alta <sup>[91]</sup>. Per altra banda, la sensibilitat a l'IP3 sembla dependre de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  dins dels dipòsits i sembla màxima quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal és màxima <sup>[92]</sup>.

Aquest sistema d'activació cel·lular mitjançant l'IP3 és universal excepte pel que fa als eritròcits humans, on aquest sistema no té efectes sobre el transport de  $\text{Ca}^{2+}$  i on no s'ha trobat un agonista natural capaç d'induir un augment significatiu de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular <sup>[79]</sup>.

En el reticle sarcoplàsmic, endoplàsmic o en el sistema tubular dens trobem a més del canal  $\text{Ca}^{2+}$ -específic activat per l'IP3, els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a l'alcaloide "ryanodine" i a la cafeïna, molt sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ . D'aquesta manera, un augment petit de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ja sigui per entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana citoplàsmica o per entrada pels canals del  $\text{Ca}^{2+}$  IP3-dependents des del sistema tubular dens o des del reticle sarcoplàsmic, produeix una **sortida explosiva de  $\text{Ca}^{2+}$**  dels dipòsits intracel·lulars per un mecanisme de *feed-back* positiu. D'aquesta manera, el **IP3 i el  $\text{Ca}^{2+}$  actuen com a co-agonistes** per l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars quan es produeix l'activació cel·lular. Quan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  és d'uns 300nmols/L, actua com a *feed-back* negatiu per l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[93]</sup>.

Recentment, s'han descrit altres mecanismes d'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$ , però encara no és ben conegut el seu funcionament [79]. Aquests canals s'activarien per missatgers intracel·lulars derivats de l'estimulació cel·lular, com són altres fosfoinositols de membrana diferents de l'IP3, l'àcid araquidònic o els seus metabòlits, com el tromboxà  $\text{A}_2$ .

### 1.2.3.2.- Mecanismes que regulen la reducció de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol està regulada principalment per unes bombes de  $\text{Ca}^{2+}$  que actuen tant a nivell de la membrana plasmàtica, expulsant el  $\text{Ca}^{2+}$  a l'exterior de la cèl·lula, com a nivell dels dipòsits intracel·lulars, recaptant el  $\text{Ca}^{2+}$  al seu interior.

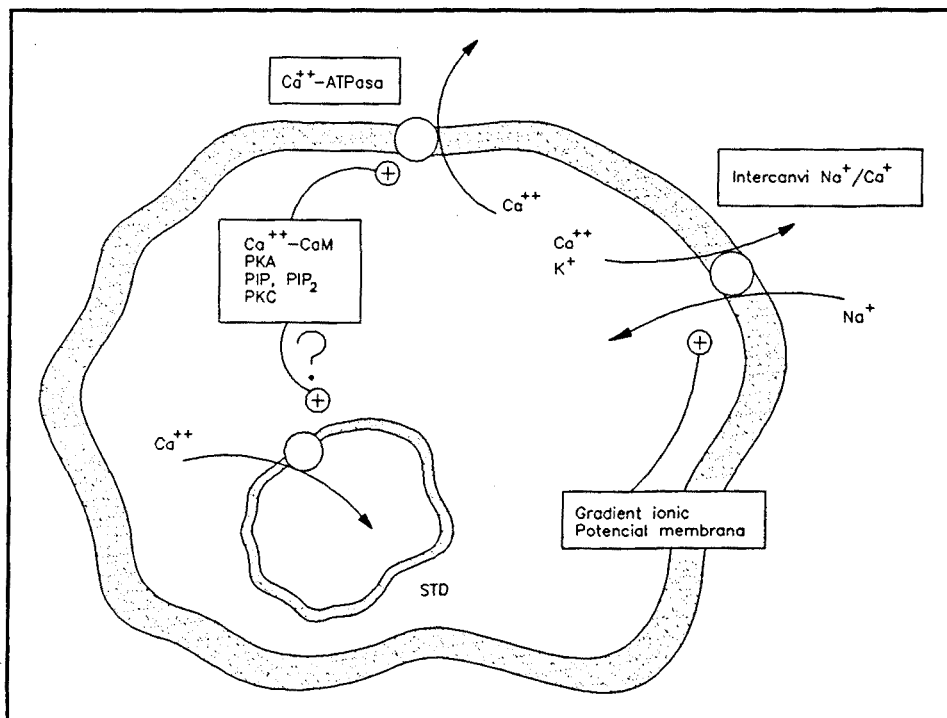


Figura 8. Regulació de la concentració de calci intraplaquetari



■ A través de la membrana cel·lular

**Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$**

La membrana plasmàtica poseeix una bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa) que expulsa el  $\text{Ca}^{2+}$  fora de la cèl·lula i que té un paper molt important en la regulació de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Es pensa que aquesta bomba és present a **totes les cèl·lules eucariotes** <sup>[94]</sup>, incloses les hematies. Transporta un mol de  $\text{Ca}^{2+}$  per un mol d'hidròlisi d'ATP i funciona com un intercanviador obligatori de  $\text{H}^+$ . Aquesta bomba és un enzim multiregulat <sup>[79]</sup>. S'estimula a) per la proteïna fixadora de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, la calmodulina, quan s'uneix a un locus específic de l'ATPasa, b) per fosforilació a través de la quinasa dependent de l'AMPc (la proteïnquinasa A o PKA), c) pels fosfatidilinositols PIP i PIP2 i d) per la PKC <sup>[95]</sup> encara que no és prou coneguda la transcendència fisiològica d'aquests processos com a regulació global de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

**Intercanvi  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**

L'intercanvi  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  proporciona un mecanisme alternatiu i/o additiu a les bombes de  $\text{Ca}^{2+}$  per expulsar el  $\text{Ca}^{2+}$  quan la cèl·lula és activada <sup>[96]</sup>. El procés es guia bàsicament pels gradients iònics transmembrana i pel potencial de membrana.

En les **plaquetes**, diferents fets recolzen l'existència d'aquest intercanviador <sup>[97-99]</sup>: a) la substitució del  $\text{Na}^+$  extracel·lular augmenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que es recupera en afegir  $\text{Na}^{+65}$  i b) l'ouabaïna (inhibidor de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa) també augmenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  <sup>[100]</sup>. A més, l'extrusió de  $\text{Ca}^{2+}$  és dependent del  $\text{Na}^+$  extracel·lular <sup>[97]</sup> i també sembla ser que aquest intercanviador co-transportaria  $\text{K}^+$  amb el  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[101]</sup>, relacionant l'homeòstasi intracel·lular del  $\text{Ca}^{2+}$  amb el transport de membrana de cations monovalents.

■ A través de la membrana dels dipòsits intracel·lulars

En el reticle sarcoplàsmic de les cèl·lules musculars llises hi ha bombes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa): aquesta bomba transporta 2 mols de  $\text{Ca}^{2+}$  per mol d'ATP

hidrolitzat <sup>[102]</sup> en un procés cooperatiu que implica un canvi de conformació de la proteïna. En les cèl·lules no musculars, l'estructura i el mecanisme d'aquestes bombes no són tan ben conegudes. En les **plaquetes** humanes s'ha descrit dos tipus de bombes de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[103]</sup>: una estaria localitzada en el sistema reticular dens i una altra en el sistema canalicular de membrana. Encara que, en general, les bombes de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle endoplàsmic poden ser estimulades per l'AMPc <sup>[104]</sup> i per la PKC <sup>[105]</sup>, no hi ha conclusions fermes respecte a la regulació d'aquestes bombes <sup>[79]</sup>

### **1.2.3.3.- Mecanismes de tamponament de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$**

Donat que el contingut total de  $\text{Ca}^{2+}$  a les cèl·lules és superior a 1 mmol/L <sup>[102]</sup> i la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal és de l'ordre de 100 nmol/L, **més del 99.9% del  $\text{Ca}^{2+}$  total està emmagatzemat en els dipòsits intracel·lulars.** A més del procés d'emmagatzematge dependent de l'energia de l'ATP, existeix un tamponament intracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$  que no depèn de l'ATP i que actua per unió del  $\text{Ca}^{2+}$  a: a) components de la membrana com els fosfolípids, b) metabòlits citosòlics com els fosfats i c) proteïnes fixadores de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[106]</sup> la més important de les quals a nivell citosòlic és la calmodulina, però hi ha d'altres tant a nivell citosòlic (annexines) <sup>[107]</sup> com dins del reticle endoplàsmic (calsequestrina, calreticulina) <sup>[108]</sup>.

En les mitocondries, encara que també tenen una certa capacitat d'emmagatzematge del  $\text{Ca}^{2+}$ , aquesta propietat no té funcions de reservori <sup>[109]</sup>, ja que els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic i mitocondrial canvien paral·lelament. Aquest sistema tindria primordialment la funció de controlar la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  dins de la matriu mitocondrial, i només funcionaria segrestant  $\text{Ca}^{2+}$  quan hi hagués una sobrecàrrega patològica de  $\text{Ca}^{2+}$  que pogués afectar la funció cel·lular.

## 2.- EL FUNCIONAMENT PLAQUETARI EN LA GESTACIÓ NORMAL

La gestació normal està associada a un estat d'hipercoagulabilitat fisiològic, en el qual l'activació plaquetària *in vivo* no és més que una de les seves característiques <sup>[2,110-112]</sup>. El sistema hemostàtic pateix profunds canvis durant la gestació que són necessaris per protegir la zona d'implantació placentària <sup>[113]</sup> i per preparar l'organisme pel moment del deslliurament. Aquests canvis que es donen en l'embaràs normal en els mecanismes hemostàtics, resulten adequats per **garantir una correcta implantació i per evitar una excessiva pèrdua hemàtica al part**, però l'alteració en la seva regulació pot comportar que hi hagi un augment de patologies tals com la malaltia tromboembòlica <sup>[114]</sup>, la coagulació vascular disseminada o els trastorns hipertensius de l'embaràs, en les quals la gestació per si mateixa constitueix un factor de risc. Tant és així, que en els països desenvolupats, els trastorns hipertensius de l'embaràs junt amb els trastorns hemorràgics i trombòtics són la principal causa de morbimortalitat materna <sup>[115]</sup>.

Encara que hi ha evidències d'alteracions en diferents esglaons del sistema hemostàtic - en l'hemostàsia primària, en la coagulació i en la fibrinòlisi-, en aquesta tesi abordarem únicament les modificacions induïdes per l'embaràs normal i patològic en el comportament plaquetari, ja que les plaquetes semblen tenir un paper destacat en la fisiopatologia dels trastorns hipertensius de l'embaràs.

## 2.1.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA *in vivo* EN LA GESTACIÓ NORMAL

En l'estudi de placentes procedents de gestacions normals s'han observat dipòsits de fibrina, indicant que probablement hi ha una activació local del sistema de coagulació <sup>[111]</sup>. Altres evidències de l'activació plaquetària *in vivo* durant la gestació són les que aporten els estudis de paràmetres plaquetaris en sang perifèrica, els de mesura de productes de secreció plaquetària al plasma i els de mesura de metabòlits de les prostaglandines a l'orina.

### ■ Paràmetres plaquetaris en sang perifèrica en la gestació

Des de la utilització de comptadors automàtics als laboratoris d'hematologia, han aparegut diversos estudis que investiguen les variacions en el recompte de plaquetes i en el volum plaquetari al llarg de la gestació.

En quant al **recompte de plaquetes (PL)**, els resultats són contradictoris i mentre que alguns estudis refereixen una disminució del nombre de plaquetes al final de la gestació <sup>[116-118]</sup>, altres estudis no han constatat aquest fet <sup>[12,119-121]</sup>. Els criteris d'inclusió i exclusió dels diferents treballs no són unànimes i, en conclusió, sembla raonable pensar que hi ha una gran variabilitat individual <sup>[122]</sup> i que, en general, no hi ha un canvi significatiu en el recompte plaquetari al llarg de la gestació.

Els resultats en quant al **volum plaquetari mig (VP)** i a la mida de la **distribució plaquetària (PD)** són més concordants. La majoria dels estudis refereixen un augment en ambdós paràmetres, indicant la presència d'una població de plaquetes més grosses i per tant, més immadures en sang perifèrica <sup>[116,12,121]</sup>. Quan hi ha un consum o una destrucció plaquetària perifèrica <sup>[123]</sup>, hi ha un increment en els índexs que valoren la grandària de les plaquetes (VP i PD). Això seria així perquè

augmentaria la proporció de plaquetes joves circulants, o bé també podria ser degut a canvis en la generació de plaquetes per part dels megacariòcits <sup>[124]</sup>. Independentment del mecanisme, el cert és que l'increment d'aquests dos paràmetres en la gestació normal, suporta la **hipòtesi del consum perifèric**, que seria probablement degut a la formació de microtrombus. En la gestació normal, si la funció dels megacariòcits és correcta i compensa el consum perifèric, el recompte plaquetari es mantindria sense canvis significatius.

■ Vida mitjana de les plaquetes

Si partim de la idea abans referida del consum plaquetari perifèric, hauríem de poder demostrar també una disminució de la vida mitjana de les plaquetes. La impossibilitat de poder utilitzar mètodes de marcatge radiactiu en la gestació limita l'exploració d'aquest paràmetre. Un mètode proposat és el que segueix la recuperació de la **producció de malondialdehid** després de l'administració d'una única dosi d'aspirina. Aquests estudis han revelat una petita reducció, no significativa, de la vida mitjana plaquetària <sup>[125,126]</sup>. La crítica a aquests estudis és que l'aspirina, encara que en dosi única, és una potent inhibidora dels mecanismes d'activació, i per tant, pot fer que s'allargui la vida mitjana de les plaquetes, que en circumstàncies de gestació presentarien una reducció d'aquest paràmetre si ho poguéssim valorar per mètodes convencionals.

■ β-tromboglobulina i Factor plaquetari 4

Aquests dos components són proteïnes contingudes en els **grànuls α** de les plaquetes. Diversos estudis han demostrat l'augment de β-tromboglobulina al plasma de gestants normals de tercer trimestre respecte a controls no-gestants <sup>[126-128]</sup>. Aquest fet fa pensar en una activació plaquetària al final de la gestació. Encara que la β-tromboglobulina és eliminada del plasma pel ronyó i

l'augment plasmàtic d'aquesta proteïna podria ser deguda a una disminució de la funció renal <sup>[129]</sup>, en la gestació normal hi ha un augment ben demostrat en l'índex de filtració glomerular <sup>[130]</sup>, de manera que aquest fet no explicaria l'increment d'aquesta proteïna a plasma. És més, un estudi que mesura les variacions de la  $\beta$ -tromboglobulina i del factor plaquetari 4 (que s'elimina principalment a través de l'endoteli <sup>[129]</sup>) en la gestació, demostra que el nivell d'ambdues proteïnes augmenta de forma paral·lela en el plasma de la gestant de tercer trimestre<sup>[127]</sup>.

■ Metabòlits urinaris del tromboxà

El mètode més fidedigne de valorar *in vivo* la producció de tromboxà és mesurar en orina els metabòlits estables del tromboxà  $A_2$  ( $TXA_2$ ): el  $TXB_2$  en les seves dues formes estables, el 2,3-dinor-tromboxà  $B_2$  i l'11-dehidro-tromboxà  $B_2$ . S'ha demostrat que aquests metabòlits augmenten a orina de manera precoç, aproximadament a les 20 setmanes, i que aquesta elevació es manté al llarg de la gestació <sup>[5]</sup>.

## 2.2.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA *in vitro* EN LA GESTACIÓ NORMAL

Els estudis *in vivo* abans referits ratifiquen el fet que les plaquetes estan activades en la gestació normal, però això podria ser degut bé a una alteració intrínseca de les plaquetes, bé a un estímul extern que fa que aquestes s'activin o a una combinació d'ambdós factors.

- Estudis d'agregació plaquetària en plasma ric en plaquetes

Hi ha molts estudis publicats sobre agregació plaquetària en plasma ric en plaquetes (PRP). Els resultats són variats probablement degut a diferències en el mètode experimental, el paràmetre analitzat, el tipus i la concentració d'agonista utilitzat i els pacients seleccionats per l'estudi. Alguns estudis han referit que no hi ha canvis en els patrons d'agregació en PRP durant la gestació normal <sup>[131]</sup>, i alguns altres refereixen una disminució en la resposta a agents agregants durant l'embaràs <sup>[132,133]</sup>. En canvi, estudis que investiguen la mínima dosi d'agregant necessària per induir una agregació màxima, mostren que en la gestació normal hi ha un augment de reactivitat: per exemple, la mínima dosi necessària d'ADP que indueix una agregació irreversible està disminuïda en el tercer trimestre de gestació <sup>[128,134,135]</sup>. Hi ha també un estudi que demostra com una agregació secundària en resposta a baixes dosis d'adrenalina, s'observa més freqüentment a gestants que en controls no-gestants <sup>[134]</sup>.

Altres estudis aporten l'evidència d'un augment de la reactivitat plaquetària en resposta a l'agregació induïda per l'àcid araquidònic (AA) comparant gestants normals i controls no-gestants. El patró d'agregació en les pacients embarassades torna dins dels límits dels controls a les 6 setmanes postpart <sup>[11,7]</sup>.

La influència de factors tals com l'hematòcrit i l'albumina plasmàtica haurien de ser considerats en aquests tipus d'estudis. Partint del fet que l'AA circula unit a l'albumina, caldria suposar que la reducció en l'albumina plasmàtica que es dona d'una manera fisiològica a la gestació, resultaria en un augment del nivell d'AA lliure disponible per l'activació plaquetària. Tot i així, hi ha estudis que demostren que no hi ha cap correlació entre l'hematòcrit i els paràmetres d'agregació <sup>[7]</sup>, o entre els nivells plasmàtics d'albumina i l'agregació induïda per l'AA <sup>[11,7]</sup>.

■ Estudis d'agregació plaquetària en sang total

Els estudis d'agregació plaquetària en sang total, basats en el mètode d'impedància elèctrica, intenten explorar el comportament plaquetari en un **medi més fisiològic**, deixant actuar els factors que d'una manera espontània actuen *in vivo*. En general, mostren un augment de l'agregació plaquetària en resposta a diferents agonistes com l'ADP, el col·lagen i l'àcid araquidònic <sup>[136]</sup>. Louden *et al.* <sup>[137]</sup> mostren un augment de l'agregació en resposta a l'AA a les 16 setmanes i a l'adrenalina a partir de les 28 setmanes. A les 6 setmanes postpart no hi ha diferències significatives amb els nivells d'agregació preconceptionals, encara que la resposta als agonistes està discretament augmentada.

■ Estudis d'alliberació plaquetària

Hi ha menys estudis que explorin la reacció d'alliberació plaquetària. Tot i així, les dades disponibles sobre estudis que investiguen l'alliberació de grànuls densos, reflecteixen que hi ha una reactivitat plaquetària augmentada. Aquests estudis s'han portat a terme, bàsicament amb el **marcatge de la serotonina** amb carboni 14 (<sup>14</sup>C-5-hidroxitriptamina); alguns han estat realitzats amb PRP <sup>[138]</sup> i altres amb sang total <sup>[137]</sup>. Algun estudi, però, no ha pogut demostrar diferències <sup>[7]</sup>.



- Valoració general de la reactivitat plaquetària a través dels estudis d'agregació i alliberació.

En resum i a tenor dels resultats presentats pels estudis d'agregació i alliberació, hi ha evidències que existeix en la gestació normal un augment de la reactivitat plaquetària. Aquest augment és detectable en alguns casos tant precoçment com en el segon trimestre i persisteix durant la resta de l'embaràs, revertint a les 6-12 setmanes postpart fins a nivells comparables als controls no-gestants.

En general, les alteracions del comportament plaquetari són més evidents quan l'agonista utilitzat en l'estudi és dependent de la formació de tromboxà per la seva acció, com per exemple l'AA<sup>[11,7,137]</sup>, l'adrenalina<sup>[134,137]</sup>, i la segona fase de l'agregació en resposta a l'ADP<sup>[128,134,135]</sup>. Aquest fet posa en evidència que el tromboxà A<sub>2</sub> té un paper destacat en aquest augment de la reactivitat plaquetària en la gestació normal, encara que desconeixem si això és degut a un increment en la síntesi de tromboxà o a un augment en la sensibilitat de la plaqueta a aquest agent. Encara que alguns estudis demostren un increment de la producció *in vivo* de TXA<sub>2</sub><sup>[5]</sup>, estudis *in vitro* mostren resultats contradictoris com veurem a continuació.

- Estudis sobre la producció de tromboxà A<sub>2</sub> *in vitro*

Els estudis publicats refereixen nivells sèrics de tromboxà B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), el metabòlit estable del TXA<sub>2</sub> produït per hidròlisi. Aquests nivells reflecteixen la producció de tromboxà després de l'agregació espontània de sang total *in vitro*. Els resultats són dispars: encara que sembla que en la gestant la producció de tromboxà estaria augmentada respecte a la no-gestant, la qual cosa es manifestaria amb uns nivells més elevats de TXB<sub>2</sub><sup>[139]</sup>, no sembla que els nivells de TXB<sub>2</sub> es modifiquin durant la gestació<sup>[126,137,138]</sup>. Possiblement, els nivells de TXB<sub>2</sub> a sèrum no expressen altres

canvis en la via de la síntesi del tromboxà, però sí que s'ha demostrat que es correlacionen amb la quantitat de tromboxà alliberat pels grànuls de les plaquetes durant l'agregació en PRP <sup>[139]</sup>. La contribució de la quantitat, en valors absoluts, de tromboxà sintetitzat per les plaquetes a l'augment de la reactivitat plaquetària en la gestació, és una qüestió que queda encara per resoldre i la possibilitat que hi hagi modificacions en la sensibilitat de les plaquetes en el tromboxà és una hipòtesi que ha de ser confirmada.

■ Estudis de sensibilitat plaquetària als agents inhibidors del seu comportament

Diferents investigadors han referit que durant la gestació existeix una **reducció de la sensibilitat plaquetària a la inhibició de l'agregació *in vitro*** induïda per prostaciclina o els seus anàlegs estables <sup>[138,140-145]</sup>. Aquest fet s'ha observat quan s'utilitza ADP o AA per induir l'agregació.

Fora del context de la gestació, s'ha observat que la incubació de PRP *in vitro* amb inhibidors de la tromboxàsintetasa (TSI), diferencia les pacients en a) *responedores*, el comportament plaquetari de les quals queda inhibit i b) *no-responedores*, les plaquetes de les quals no queden inhibides <sup>[146]</sup>. Dos estudis han demostrat que la majoria (>90%) de les dones gestants són *no-responedores* als inhibidors de la tromboxàsintetasa, mentre que entre els controls no-gestants en edat fèrtil només un 30% es poden classificar en aquesta categoria <sup>[7,144]</sup>.

Altres estudis han demostrat que les plaquetes de dones gestants de tercer trimestre mostren una disminució en la sensibilitat als efectes inhibidors *in vitro* no només de la prostaciclina i els TSI sinó també de la PGD<sub>2</sub>, de la forskolina (que activa directament l'adenilciclasa) i d'un inhibidor de la fosfodiesterasa de l'AMPc (l'AH-P719) <sup>[138]</sup>. Tots aquests agents actuen com a inhibidors del comportament plaquetari incrementant els nivells d'AMPc en la plaqueta <sup>[147,148]</sup>. En el cas dels TSI, això succeeix indirectament en formar-se PGD<sub>2</sub> com a metabòlit per una via

alternativa quan la tromboxàsintetasa està bloquejada<sup>[149-151]</sup>. Aquesta PGD<sub>2</sub> actua aleshores augmentant l'AMPc que inhibeix l'activació plaquetària. Encara que la majoria d'estudis amb manipuladors de l'AMPc són fets amb dissenys transversals al tercer trimestre de gestació, alguns estudis longitudinals demostren una disminució de la sensibilitat als TSI i a la prostaciclina a la 16<sup>a</sup> setmana de gestació<sup>[7]</sup> i al segon trimestre<sup>[140,141]</sup> respectivament.

La conclusió que podem treure d'aquests fets és que hi ha una **disminució en la resposta de les plaquetes de les dones gestants als agents que incrementen la formació d'AMPc**. Això pot ser degut a a) que les plaquetes de les dones gestants són menys sensibles als efectes de l'AMPc o b) que aquestes plaquetes tenen reduïda la capacitat de sintetitzar AMPc. Aquesta disquisició serà revisada en el punt següent.

- Els segons missatgers en la gestació: el paper del calci intracel·lular i l'AMPc.

Després dels estudis que demostren l'evidència d'alteracions en el comportament plaquetari en el sentit d'un augment en la seva reactivitat, les investigacions s'han dirigit a estudiar els mecanismes que porten a aquesta situació. Objecte d'estudis recents han estat els sistemes intracel·lulars de segons missatgers, com són la concentració de calci intracel·lular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) i l'AMPc. **Els resultats actuals, però, són diversos:** el primer estudi publicat sobre les modificacions de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el tercer trimestre de gestació refereix que no hi ha canvis en els nivells basals ni després de l'estimulació amb ADP o serotonina<sup>[19]</sup>. Un altre treball refereix un discret augment en els nivells basals de la  $[Ca^{2+}]_i$  sense diferències després de l'estimulació amb trombina o angiotensina II<sup>[21]</sup>. Diferències en el mètode poden explicar aquestes divergències i, per altra banda, en aquests estudis s'emprava el quin-2 com a marcador del calci intracel·lular, mentre que en els estudis actuals s'utilitza la fura-2, que té la propietat de ser menys quelant del calci<sup>[152]</sup>. Hi ha un estudi recent, utilitzant fura-2 com a marcador, que demostra un augment en

la  $[Ca^{2+}]_i$  en el tercer trimestre de la gestació <sup>[18]</sup>. Els mateixos autors presenten un estudi longitudinal que confirma aquestes troballes i refereix que l'augment de la  $[Ca^{2+}]_i$  es produeix de manera significativa al voltant de les 28 setmanes d'edat gestacional, mentre que a les 6 setmanes postpart els nivells tornen als valors inicials <sup>[153]</sup>. Una explicació a aquest fet és que les plaquetes de les gestants, tenint un nivell basal més elevat de calci intracel·lular, requeririen d'una menor elevació dels nivells de calci després de l'estimulació per un agonista, per arribar al dintell necessari per desencadenar l'agregació i alliberació de grànuls <sup>[154]</sup>. També cal destacar que la fosfolipasa  $A_2$ , enzim encarregat de la mobilització de l'àcid araquidònic des dels fosfolípids de la membrana plaquetària i que desembocarà en la producció de  $TXA_2$ , és molt dependent del calci <sup>[155]</sup>. Per contra, hi ha estudis fora del context de la gestació que demostren una pobra correlació entre els nivells basals de la  $[Ca^{2+}]_i$  i la reactivitat plaquetària <sup>[156]</sup>. També és possible que l'increment en la  $[Ca^{2+}]_i$  basal *in vitro* sigui producte d'un cert grau d'activació plaquetària *in vivo* i no sigui aquest el factor mediador de l'augment de la reactivitat plaquetària durant la gestació; amb altres paraules, que **podríem estar detectant la conseqüència (de l'activació plaquetària) i no la causa** <sup>[154]</sup>. Cal esperar els resultats de nous estudis per aclarir aquest punt.

L'altre segon missatger objecte d'estudi ha estat l'AMPC, que actua com a factor inhibidor de l'activitat plaquetària. Com hem vist abans, hi ha diversos estudis que demostren la disminució de la sensibilitat de les plaquetes de dones hipertenses, als efectes inhibidors de diferents agents que actuen augmentant els nivells d'AMPC <sup>[138,143,144]</sup>.

Un primer estudi que valorava els nivells d'AMPC basals i després de l'estimulació amb  $PGE_1$ , no refereix diferències entre plaquetes de dones gestants i controls no-gestants <sup>[157]</sup>. Aquest estudi es referia però, a 5 gestants estudiades al tercer trimestre. Darrerament s'han presentat dos treballs de disseny transversal, que estudien els nivells *in vitro* d'AMPC basal i després de la utilització d'estimuladors

de l'adenilciclasa (que augmenten la síntesi d'AMPc) i d'inhibidors de la AMPc-fosfodiesterasa (enzim que metabolitza l'AMPc) <sup>[138,144]</sup>. Els resultats mostren que **les dones gestants de tercer trimestre produeixen menys AMPc** que els controls no-gestants en resposta als estimuladors de l'adenilciclasa. Pel contrari, no hi van haver diferències en els nivells d'AMPc basals i després d'utilitzar inhibidors de la fosfodiesterasa. Aquests resultats concorden amb la hipòtesi d'una **reducció de la sensibilitat de les plaquetes de les dones gestants a l'efecte inhibidor de la prostaciclina i a altres agents que actuen via síntesi d'AMPc**. Aquesta disminució en la síntesi d'AMPc postestimulació es dona tant si s'estimula l'adenilciclasa via receptors de superfície-proteïnes G, com en resposta a la forskolina que actua directament sobre l'enzim adenilciclasa. El mecanisme exacte d'aquests canvis no és encara conegut, però cal pensar que la gestació per si mateixa condiciona un canvi, potser de conformació, en aquest enzim, que el fa menys responent als agents estimulants.

Tal com comentàvem abans, en aquest punt de les investigacions **no es pot concloure si les modificacions observades en les plaquetes de les gestants són causa o conseqüència dels canvis en la reactivitat plaquetària**; hem de tenir en compte però, que si la resposta de l'AMPc plaquetari està disminuïda *in vivo*, les plaquetes estarien responent d'una manera defectuosa a alguns mecanismes reguladors fisiològics molt importants, com al de la prostaciclina, i això contribuiria d'una manera important a l'activació plaquetària que té lloc a la gestació <sup>[154]</sup>.

### **3.- FISIOPATOLOGIA DELS TRASTORNS HIPERTENSIVS DE L'EMBARÀS**

#### **3.1.- INTRODUCCIÓ**

En els països desenvolupats, els trastorns hipertensius de l'embaràs (THE) i les seves complicacions, constitueixen una de les principals patologies amb que s'enfronta l'Obstetrícia actual, amb una important incidència tant sobre la morbimortalitat fetal com sobre la materna.

Els THE i les seves complicacions són actualment, en els països on s'ha controlat la mortalitat d'etiologia infecciosa i hemorràgica, la principal causa de mort materna. Els THE poden produir a la dona embarassada les mateixes complicacions que la hipertensió pot causar fora de l'embaràs tals com hemorràgies cerebrals, insuficiència ventricular esquerra, insuficiència renal....etc. A aquestes complicacions es sumen les que poden aparèixer més específicament per l'existència de l'embaràs com l'eclàmpsia, la ruptura hepàtica, el desprendiment precoç de placenta i coagulopaties més o menys severes. A nivell assistencial graven de forma important els ingressos avant i postpart i augmenten l'intervencionisme obstètric amb un major nombre d'induccions i cesàries. També cal dir que, en l'aspecte econòmic, augmenten considerablement els costos, donat que són una de les principals causes d'ingrés durant la gestació, perllonguen de manera important l'estança hospitalària en l'època perinatal i necessiten d'un major nombre de visites i exploracions complementàries per assegurar el bon resultat tant matern com fetal.

En l'aspecte fetal, els THE graven la mortalitat perinatal sobretot avantpart i intrapart i augmenten les taxes de prematuritat i patiment fetal. La majoria dels casos en els quals el fetus presenta un retard del creixement intrauterí de tipus extrínsec, tenen lloc en gestants hipertenses; Cabero <sup>[158]</sup> refereix a la seva casuística que la incidència de retard de creixement intrauterí en la preeclàmpsia lleu i greu és d'un 18.8% i d'un 37.3% respectivament, molt superiors a les xifres de la població gestant normal. Això dona lloc, a nivell assistencial, a un major nombre d'ingressos en unitats de cures intensives neonatals, així com a una més gran incidència de lesions neurològiques permanents que afecten la vida ulterior de l'individu. A més a més, els nadons d'aquestes gestants necessiten amb major freqüència d'un ingrés hospitalari més llarg, sobretot per patologia relacionada amb el seu pes i l'edat gestacional.

Així doncs, les qüestions aquí referides argumenten l'interès i la necessitat que la comunitat científica del nostre àmbit té d'avançar en el coneixement de les causes i la fisiopatologia d'aquests trastorns. L'objectiu és no sols tractar de controlar-los quan apareixen sinó, en el millor dels casos, poder-ne fer una bona profilaxi.

### 3.2.- CONCEPTE I CLASSIFICACIÓ

La hipertensió i la proteïnúria són dues reconegudes patologies que poden complicar l'embaràs. El fracàs dels intents de trobar una nomenclatura i classificació consensuades és degut principalment a la falta de coneixement de l'autèntica naturalesa i causa d'aquests trastorns. Les discrepàncies en la seva terminologia i classificació demostren, doncs, la dificultat que hi ha per a determinar el substracte real de la patologia.

L'estudi dels trastorns hipertensius de l'embaràs té una llarga història de classificacions i conceptes terminològics. A efectes d'aquesta tesi, **hem adoptat els criteris de Davey i Gillivray** <sup>[159]</sup>, que estableixen una classificació clínica dels trastorns hipertensius de l'embaràs que darrerament sembla la tendència més generalitzat, i que va estar **adoptat per la *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)*** en el VII World Congress of Hypertension in Pregnancy, Perugia 1990. Aquest criteri adjudica el terme "Trastorns Hipertensius de l'Embaràs" al conjunt d'aquestes alteracions i les classifica com es descriu a continuació:

- Definició d'hipertensió en l'embaràs

S'admet que existeix hipertensió en l'embaràs quan la pressió arterial diastòlica (mesurada segons les recomanacions de l'OMS) és igual o superior a 90 mmHg en dues preses consecutives separades 4 hores o més, o  $\geq$  110 mmHg en una sola determinació.

La pressió diastòlica en la dona gestant correspon a la IV fase de Korotkoff. La hipertensió es considerarà greu si la tensió arterial sistòlica és igual o superior a 160 mmHg o si la tensió arterial diastòlica és igual o superior a 110 mmHg en dues determinacions. Si no es dona aquest supòsit, la hipertensió serà catalogada de lleu.



▪ Definició de proteïnúria en l'embaràs

Es defineix com a tal quan en l'orina de 24 hores es detecta un total de 300 mg de proteïnes; si s'utilitza una mesura qualitativa amb tires colorejades, cal considerar les següents equivalències: 1+ són 0,3-0,45 g/L, 2+ són 0,45-1 gr/L, 3+ són 1-3 g/L i 4+ més de 3 g/L. Cal considerar una proteïnúria significativa quan hi ha aparició dues vegades o més d'1+ o quan apareix una sola vegada 2+ o més.

Així doncs, segons els criteris establerts per Davey i MacGillivray, els trastorns hipertensius de l'embaràs es classifiquen de la següent manera:

**A. Hipertensió gestacional i/o proteïnúria:**

Hipertensió i/o proteïnúria de debut posterior a les 20 setmanes d'edat gestacional que es presenta avantpart, en el part o en el puerperi, en una pacient prèviament normotensa i no-proteïnúrica.

1. Hipertensió gestacional (sense proteïnúria)
2. Proteïnúria gestacional (sense hipertensió)
3. Hipertensió proteïnúrica gestacional o preeclàmpsia: hipertensió + proteïnúria

**B. Hipertensió crònica o malaltia renal crònica:**

Hipertensió i/o proteïnúria en una pacient prèviament hipertensa o amb patologia renal crònica, que es presenta avantpart, en el part o en el puerperi.

1. Hipertensió crònica: hipertensió sense proteïnúria
2. Malaltia renal crònica: proteïnúria amb o sense hipertensió
3. Hipertensió crònica amb preeclàmpsia sobreafegida: proteïnúria significativa durant la gestació a pacient hipertensa crònica.

**C. Hipertensió o proteïnúria no classificades:**

Hipertensió o proteïnúria que es troba: a) en la primera visita després de les 20 setmanes d'edat gestacional en una pacient de la qual es desconeix hipertensió o patologia renal preexistent o b) durant la gestació, part o puerperi quan no es disposa de més informació per la classificació de la pacient en una de les altres categories.

1. Hipertensió no classificada (sense proteïnúria)
2. Proteïnúria no classificada (sense hipertensió)
3. Hipertensió proteïnúrica no classificada

**D. Eclàmpsia:**

Convulsions generalitzades durant la gestació, part o 7 dies postpart, no causades per epilèpsia o altres trastorns convulsius. Actualment s'està considerant també incloure en aquesta categoria l'aparició d'altra simptomatologia neurològica com podrien ser accidents vasculars cerebrals.

### 3.3.- FISIOPATOLOGIA

Tot i que les teories sobre la fisiopatologia dels trastorns hipertensius de l'embaràs en general fan referència a tot el grup de trastorns en conjunt, la preeclàmpsia és l'entitat clínica aïllada més ben estudiada, ja que en certa manera representa el trastorn pur i en la seva màxima expressió, donat que és un quadre greu, relativament freqüent, que apareix *de novo* a la gestació i que es resol després de la mateixa. Per tant, podem estudiar a través d'ella la gènesi i resolució d'un trastorn hipertensiu, i d'aquesta manera entendre les altres entitats que s'agrupen sota el terme general de trastorns hipertensius de l'embaràs. Així doncs, en aquest punt ens referirem en concret a la fisiopatologia de la preeclàmpsia.

La preeclàmpsia està associada a vasoespasme, lesions vasculars en tots els òrgans de l'economia (inclòs el llit vascular útero-placentari), augment de l'activació plaquetària amb consum plaquetari i conseqüent activació del sistema de la coagulació a nivell microvascular. Es desenvolupa durant la gestació, i principalment en dones nul·lípare, resolent-se el quadre dies després del part. No s'ha detectat un model en experimentació animal i complica el 6-8 % de les gestacions de més de 24 setmanes. En el nostre medi, la incidència és molt més baixa: Cabero <sup>[160]</sup> refereix una incidència de trastorns hipertensius de l'embaràs que oscil·la entre un 1.6% per les nul·lípare i un 1% per les múltiples. En el nostre centre que actua com a centre de referència, la incidència d'hipertensió gestacional és d'un 2-3%, la de preeclàmpsia és d'un 1.5%-2% i la d'hipertensió crònica és d'un 2-3%. En molts països, els trastorns hipertensius de l'embaràs són la causa més important de mort materna <sup>[161,162]</sup>, i d'acord amb la OMS és la principal causa de morbimortalitat perinatal <sup>[163]</sup>.

Durant la gestació, tenen lloc canvis importants en la fisiologia general materna i en particular en el sistema cardiovascular. Aquest fet és degut probablement a

la interacció de l'al·loempelt fetal (patern) amb el teixit matern. El desenvolupament de la tolerància immunològica mútua <sup>[164]</sup> en el primer trimestre, dóna lloc a importants canvis morfològics i bioquímics en la circulació tant sistèmica com útero-placentària. Alguns d'aquests canvis han estat descrits recentment: la migració de cèl·lules del trofoblast a les parets de les artèries espirals indueix canvis morfològics en aquestes, **transformant el llit útero-placentari en un sistema d'elevada perfusió amb baixa resistència i baixes pressions**. L'adaptació de l'arbre vascular matern a nivell bioquímic es constata en canvis en el sistema de prostaglandines, que porta a un predomini de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), agent d'efecte vasodilatador i inhibidor de l'agregació plaquetària que està produïda per les cèl·lules endotelials, sobre el tromboxà A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), d'origen plaquetari i que té un efecte vasoconstrictor i activador de l'agregació plaquetària.

En la **preeclàmpsia**, s'ha demostrat per estudis d'anatomia patològica que els canvis fisiològics en les artèries espirals queden reduïts a la porció decidual de les artèries, mentre que la porció intramiometrial queda intacta i no es vasodilata. Aquest fet suggereix un **fracàs o inhibició de la segona onada de migració trofoblàstica a nivell intravascular**, compromentent les necessitats d'aport sanguini que requerirà la unitat fetoplacentària en un futur <sup>[165]</sup>.

Per altra banda, està comprovat que el sobrenadant de les cèl·lules trofoblàstiques té propietats immunosupressores, encara que aquestes substàncies no s'han pogut aïllar <sup>[166]</sup>. A més, s'ha objectivat el pas d'aquestes cèl·lules per la circulació materna a partir de les 18 setmanes d'edat gestacional.

Els factors immunològics poden jugar un paper molt important en el desenvolupament de la preeclàmpsia. Aquests fenòmens inclouen l'absència d'anticossos bloquejants, la resposta immune cel·lular disminuïda, l'activació dels neutròfils i la implicació de les citoquines <sup>[167]</sup>. El punt de la qüestió sembla ser

la paradoxa de l'al·loempelt fetal. Per què la mare no només tolera, sinó que nodreix un fetus que antigènicament és un cos estrany? El fet que la preeclàmpsia compliqui bàsicament primeres gestacions, quan hi ha un canvi de parella <sup>[168]</sup>, després d'utilitzar mètodes anticonceptius de barrera que impedeixin l'exposició materna a l'esperma <sup>[169]</sup>, o en dones amb història d'esterilitat que han quedat gestants amb mètodes de reproducció assistida, fa pensar que la **intolerància entre el teixit matern i el trofoblast fetal és un factor fonamental en l'etiologia de la preeclàmpsia**. A més, i donat que la resposta immunològica ve determinada genèticament, la predisposició genètica també ha de tenir un paper important <sup>[167,170]</sup>.

**Un delicat equilibri entre la resposta immunològica materna i el genotipus fetal pot ser el regulador del procés d'invasió trofoblàstica necessari per una placentació correcta.** La preeclàmpsia podria ser un estat de desequilibri amb una insuficient capacitat dels anticossos bloquejadors materns (al·loanticossos) que frenen la resposta immunològica materna, i/o un excés de càrrega antigènica fetal <sup>[171]</sup>. Quan aquest equilibri es trenca, tant sigui per causa materna com fetal, la invasió pot ser insuficient, la **placentació isquèmica** i això pot desembocar en els trastorns bioquímics i clínics que actualment reconeixem en la preeclàmpsia.

La decídua és possiblement l'òrgan on té lloc el reconeixement immunològic del trofoblast. La composició cel·lular en el primer trimestre, rica en cèl·lules *natural-killers* i grans limfòcits citolítics que ataquen sense preimmunització (constitueixen el 45% de totes les cèl·lules de l'estroma), ens poden fer considerar la **decídua com un òrgan limfoide**. El control de la seva activitat immunògena és segurament imprescindible per la supervivència del fetus. Per exemple, s'ha comprovat un augment d'interleukina-2 en la gestació normal <sup>[172]</sup>, que probablement està relacionat amb la inhibició de l'activitat de les cèl·lules *natural-killer* i l'absència de citotoxicitat antipaterna.

A banda d'aquests factors, en la preeclàmpsia s'ha trobat un augment de l'activació dels neutròfils, que té lloc en part al llit placentari<sup>[173]</sup>. Fora del context de la gestació, els neutròfils han estat implicats en la patogènesi de la lesió vascular. Els neutròfils activats alliberen unes substàncies: (elastases i proteases) que són lesives per les cèl·lules endotelials, la membrana basal vascular i la matriu extracel·lular del subendoteli. A més, radicals lliures tòxics són alliberats i poden causar la peroxidació dels lípids de la membrana, la lisi de les cèl·lules endotelials, la disrupció de l'endoteli i l'augment de la reactivitat i permeabilitat vasculars <sup>[174]</sup>. També es sintetitzen leucotriens, metabòlits de l'àcid araquidònic en els leucòcits, que també provoquen augment de la permeabilitat vascular, vasoconstricció i augment de l'activació i adherència dels neutròfils <sup>[175]</sup>. Particularment el leucotriè B4 que està elevat a la preeclàmpsia pot contribuir a l'arteriopatia necrotitzant que es reconeix en l'anatomia patològica de la malaltia <sup>[176]</sup>.

En resum, hi ha evidències que la lesió endotelial i/o una funció endotelial alterada, juguen un important paper en la fisiopatologia de la preeclàmpsia <sup>[177-179]</sup>. Descriurem a continuació els mecanismes fisiològics de la funció endotelial i després farem un resum de les alteracions que tenen lloc en la preeclàmpsia.

### **3.3.1.- FISIOLOGIA NORMAL DE L'ENDOTELI**

Els estudis inicials sobre fisiologia vascular presentaven resultats contradictoris, segurament perquè la capa endotelial en estudi era malmesa o fins i tot eliminada en el procediment de preparació del vas. Les cèl·lules endotelials estan adherides a la paret dels vasos per col·lagen i diferents tipus de glicosaminoglicans, incloent-hi la fibronectina <sup>[180]</sup>. Aquestes cèl·lules es disposen en una monocapa i estan en contacte directe amb la sang, en una posició estratègica pel manteniment de l'homeòstasi <sup>[181]</sup>.

L'endoteli modula la reactivitat del múscul llis vascular en resposta a estímuls vasoactius <sup>[181-183]</sup>. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) i el factor relaxant derivat de l'endoteli (EDRF de l'anglès *endothelium-derived relaxing factor*), ambdós produïts per l'endoteli, estan considerats els mediadors més importants de la vasodilatació. La prostaciclina o PGI<sub>2</sub>, és un eicosanoid que té una potent acció vasodilatadora i és inhibidora de l'agregació plaquetària <sup>[66]</sup>. El EDRF ha resultat ser l'òxid nítric <sup>[184,185]</sup>, que actua a través de la guanilciclasa (Vane 1990) i té l' L-arginina com a precursor. L'addició d'un fals precursor provoca una resposta hipertensiva <sup>[186]</sup>, cosa que no succeeix amb els inhibidors de la síntesi de les prostaglandines.

El múscul llis també es contrau per substàncies dependents de l'endoteli. Probablement les més importants són dos eicosanoids, el TXA<sub>2</sub> i la PGH<sub>2</sub>. Existeixen també uns factors constrictors derivats de l'endoteli (EDCF de l'anglès *endothelium-derived contracting factors*) independents del metabolisme de l'àcid araquidònic (Dousset 1992), la naturalesa dels quals encara no es coneix bé, però podrien ser l'anió superòxid i l'endotelina <sup>[187]</sup>. Les contraccions musculars que es produeixen en cas d'anòxia poden ser causades per l'alliberament de l'endotelina <sup>[188]</sup> i l'anió superòxid <sup>[189]</sup>, que acceleren la inactivació de l'EDRF.

Una altra funció de l'endoteli vascular és el de jugar un paper actiu en la prevenció de la formació de coàguls *in vivo*: una combinació de factors de superfície i intracel·lulars, contribueixen a aquest fet. En principi, les plaquetes no estimulades no s'adhereixen a l'endoteli <sup>[180]</sup>, però la lesió d'aquesta capa posa en contacte el corrent sanguini amb el subendoteli i es desencadena l'activació i agregació plaquetàries amb alliberació de TXA<sub>2</sub> i de components actius de la cascada de la coagulació. Aquesta qualitat antitrombogènica de l'endoteli sembla ser intrínseca de la membrana plasmàtica de la cèl·lula endotelial, i no està relacionada amb la producció de PGI<sub>2</sub>. La inhibició de la producció de PGI<sub>2</sub> no augmenta l'adhesió de plaquetes inactives, en canvi, la inhibició de l'adhesió de plaquetes activades és PGI<sub>2</sub>-dependent ja que les plaquetes activades tenen

mecanismes de modular la síntesi de PGI<sub>2</sub>. Les cèl·lules endotelials poden, a més a més, convertir els endoperòxids secretats per les plaquetes en PGI<sub>2</sub>. Aquest mecanisme és molt rellevant a nivell de la microcirculació on la proporció cèl·lula endotelial/plaqueta és >1:1. Hi ha altres mecanismes que eviten la trombosi: les plaquetes activades alliberen ADP, que és agregant, i ATP, un vasodilatador <sup>[180]</sup>. Les cèl·lules endotelials poden modular l'activitat d'aquests agents perquè disposen d'uns ectoenzims, com l'ADPasa, els quals metabolitzen ràpidament l'ADP i l'ATP a AMP i adenosina, la qual resulta ser un potent inhibidor de la funció plaquetària. L'adenosina té també un efecte vasodilatador i és considerada una hormona local que pot regular el flux sanguini <sup>[180]</sup>. A més de la PGI<sub>2</sub>, també l'EDRF format a l'endoteli inhibeix l'adhesió plaquetària <sup>[187]</sup>. El sinergisme entre la PGI<sub>2</sub> i l'EDRF és segurament degut a que utilitzen mecanismes de segons missatgers diferents, l'AMPc i el GMPc respectivament. Aquest sinergisme juga un paper important en l'equilibri de la interacció plaqueta-vas: si exposem un vas denudat d'endoteli a plaquetes activades, el vas es contrau. És precisament l'endoteli el que regula l'acció d'aquests productes plaquetaris i manté relaxat el múscul llis vascular, la qual cosa evita l'obstrucció del flux sanguini en els vasos normals <sup>[181]</sup>.

**Les propietats anticoagulants de les cèl·lules endotelials** vénen representades principalment per l'heparan-sulfat, la trombomodulina i algun tipus de proteasa. L'heparan-sulfat és una substància heparinoide que accelera la inactivació de la trombina a través de l'antitrombina III. La trombomodulina, una proteïna endotelial de superfície, accelera l'activació de la proteïna C induïda per la trombina. Cert tipus de proteases, secretades per les cèl·lules endotelials, inactiven la trombina <sup>[180]</sup>.

**També l'endoteli juga un important paper en la fibrinòlisi** a través de l'alliberació d'activadors del plasminogen <sup>[180]</sup>. Dos tipus d'activadors: el tPA (de l'anglès, *tissue type plasminogen activator*) que és el més important, i el uPA



(*urokinase type plasminogen activator*) induïxen la fibrinòlisi convertint el plasminogen en plasmina. El tPA és l'únic que les cèl·lules endotelials contenen *in vivo* i és sintetitzat i alliberat després de lesió de l'endoteli, oclusió venosa, exercici i durant la gestació. La trombina i les proteïnes sèriques estimulen l'alliberació de tPA però també produeixen un augment encara més important de l'inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI de l'anglès *plasminogen activator inhibitor*) que també deriva de l'endoteli. El PAI-1 és present al plasma, a les plaquetes, als cultius de cèl·lules endotelials, als fibroblastes i als hepatòcits. El PAI-2 només es troba a la placenta<sup>[190]</sup>. L'equilibri entre les accions pro i antifibrinolítiques de l'endoteli depèn de la influència d'altres factors externs a la cèl·lula endotelial, però és obvi que aquesta cèl·lula actua com un important factor regulador d'aquestes accions.

A tenor de l'exposició presentada, on es demostra la profunda influència que l'endoteli té en el to vascular, en el comportament plaquetari, en la coagulació i en la fibrinòlisi, no hi ha dubte que una disfunció d'aquestes cèl·lules endotelials podria tenir un paper decisiu en la fisiopatologia de la preeclàmpsia.

### **3.3.2.- LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL EN ELS TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS**

Com ja hem dit, la lesió endotelial juga un paper molt important en la patogènesi de la preeclàmpsia. Els nivells augmentats de factor VIIIAg, de fibronectina i de fibronectina-ED1+<sup>[191,192]</sup>, l'alteració del tPA i el PAI<sup>[193]</sup>, i de l'equilibri PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub><sup>[9,10,194,195]</sup>, reforcen la hipòtesi d'aquesta premisa. A més a més, l'anatomia patològica de diferents òrgans de l'economia reafirmen aquest fet: al ronyó trobem l'endoteliosi glomerular<sup>[196]</sup>, característica de la preeclàmpsia i que no es troba en altres formes d'hipertensió, i al llit placentari i a les artèries espirals

uterines trobem també canvis ultraestructurals importants respecte a la gestació normal <sup>[197,198]</sup>.

Encara que l'etiologia de la preeclàmpsia segueix essent desconeguda, treballs recents demostren que **el sistema d'eicosanoids està implicat en els mecanismes fisiopatològics** que condueixen a la manifestació dels seus signes i símptomes <sup>[194,195,199]</sup>. La preeclàmpsia comença amb una **pèrdua de la refractorietat de la resposta vasopressora a l'angiotensina II** que presenta la gestació normal. L'increment en aquesta resposta té lloc abans de qualsevol altre canvi cardiovascular <sup>[200]</sup>. Els resultats d'alguns estudis sobre aquest fet, suggereixen que el desequilibri entre els eicosanoids vasodilatadors i vasopressors pot jugar un paper important en aquest aspecte <sup>[194,195]</sup>. En el context de la preeclàmpsia, la PGI<sub>2</sub> i el TXA<sub>2</sub> són els eicosanoids més rellevants, ja que representen els dos extrems de la balança que regula la interacció plaqueta-vas. Sembla ser que la preeclàmpsia seria un **estat de relatiu dèficit de PGI<sub>2</sub> respecte a una dominància del TXA<sub>2</sub>** <sup>[194,195]</sup>. Aquest desequilibri especialment en l'àmbit de la circulació renal i úteroplacentària pot donar explicació a les manifestacions clíniques de la preeclàmpsia. L'absència de l'estimulació de l'eix renina-angiotensina-aldosterona que seria normal en el cas de l'hipovolèmia i de l'augment de la sensibilitat a agents pressors com l'angiotensina i la norepinefrina pot ser explicat per aquest **desequilibri PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>, que tindria un origen en la disfunció endotelial**. Per altra banda, l'alteració d'aquest quocient pot explicar l'activació, consum i destrucció plaquetaris i la hipoperfusió placentària que porta a trombosis i infarts placentaris i que es pot acompanyar ocasionalment d'hemòlisi microangiopàtica, donant lloc a la síndrome de HELLP (hemòlisi, enzims hepàtics elevats i plaquetopènia). El dèficit relatiu de PGI<sub>2</sub> no és però un canvi primari en la preeclàmpsia <sup>[201,202]</sup>, i hi ha alguns estudis que suggereixen més aviat un increment de la producció de TXA<sub>2</sub> que de dèficit de PGI<sub>2</sub> a partir de la mesura dels seus metabòlits a orina. De fet, en algunes pacients amb preeclàmpsia, l'excreció de metabòlits de la PGI<sub>2</sub> a orina està augmentada, però encara ho està

molt més la de  $\text{TXA}_2$ , mantenint-se la *ratio* a favor del  $\text{TXA}_2$  <sup>[203]</sup>. Aquest fet estaria explicat perquè la  $\text{PGI}_2$  actua, des d'un punt de vista general, com a **mecanisme de rescat**, en situacions d'isquèmia i hipòxia <sup>[204]</sup>, intentant restablir la funció i el metabolisme normal de l'òrgan amb la millora de la perfusió.

Per altra banda, estudis recents suggereixen que l'alliberació de EDRF de l'endoteli vascular uterí està augmentat en la gestació normal <sup>[205-208]</sup>. La circulació fetoplacentària pot generar EDRF (òxid nítric) intracel·lularment. Aquest sembla ser un dels factors claus en la vasodilatació d'aquesta zona vascular <sup>[209]</sup> i, en estudis amb rates gestants espontàniament hipertenses, és el factor antihipertensiu de la gestació, essent aquest efecte independent de la  $\text{PGI}_2$  <sup>[202]</sup>. En humans, és desconegut el pes específic de l'EDRF en la vasodilatació que es dona en la gestació normal, però està comprovada una **reducció important en l'alliberació d'EDRF** induïda per la bradidicina en cordons umbilicals de **gestants preeclàmptiques** <sup>[210]</sup>. La presència de substàncies citotòxiques per l'endoteli <sup>[177]</sup> i mitogens en el sèrum de la pacient preeclàmptica <sup>[211]</sup> podria explicar la lesió de l'endoteli, amb disminució del nombre de cèl·lules endotelials o amb alteració de la ruta enzimàtica de l'EDRF, que desembocaria en una disminució de l'alliberació d'EDRF.

Recentment, l'endotelina ha captat l'atenció en estudis fora de l'àmbit de la gestació. S'ha comprovat la seva importància en la fisiologia i la fisiopatologia cardiovasculars. L'**endotelina-1** és un pèptid que es pot trobar en el sobrenadant dels cultius de cèl·lules endotelials i que té una **molt potent acció vasoconstrictora**. De fet, és el vasoconstrictor més potent conegut i té, a més a més, un efecte molt durador <sup>[188]</sup>. La síntesi d'endotelina és induïda per un gran nombre d'estímuls químics i mecànics com la trombina, l'angiotensina II i l'estrès <sup>[188,212]</sup>. A part del seu efecte vasoconstrictor, l'endotelina pot induir l'alliberació de  $\text{PGI}_2$  i EDRF <sup>[213]</sup>. L'endoteli lesionat allibera endotelina, i a més a més, fa el múscul llis vascular més sensible als efectes vasoconstrictors de

l'endotelina <sup>[182]</sup>. L'endotelina comparteix, amb altres hormones vasoactives com l'angiotensina II, la norepinefrina i la vasopressina, l'habilitat d'activar la fosfolipasa C que condueix a la contracció muscular <sup>[212]</sup>. Sembla ser que **tindria un efecte local més que sistèmic** sobre les resistències vasculares <sup>[214]</sup>, això seria perquè l'endotelina alliberada a l'espai extracel·lular actuaria sobre el múscul llis vascular, mentre que la que arribés al corrent sanguini seria neutralitzada per la PGI<sub>2</sub> i l'EDRF i inactivada als pulmons <sup>[213]</sup>.

**L'endotelina-1 plasmàtica no està elevada o fins i tot està disminuïda en la gestació normal <sup>[215]</sup>, però sí ho està a la preeclàmpsia <sup>[216-219]</sup>.** Les pacients amb la síndrome de HELLP o amb preeclàmpsia severa tenen nivells molt elevats d'endotelina. El fet que aquesta elevació no precedeix l'aparició de la clínica, fa pensar que l'endotelina està implicada en l'aparició de les manifestacions finals de la preeclàmpsia. També està comprovat que el sèrum de pacients preeclàmptiques pot suprimir la producció d'endotelina.<sup>113</sup> Els autors d'aquest estudi postulen que aquesta podria ser una resposta per intentar nivellar l'homeòstasi de l'organisme. Quan aquest mecanisme fracassés, degut a una lesió endotelial molt extensa, es donaria el quadre florit de la preeclàmpsia (amb o sense HELLP) en tota la seva amplitud i resistent a qualsevol terapèutica.

### **3.3.3.- LA FORMACIÓ DE RADICALS LLIURES**

**La formació de radicals lliures i el procés de peroxidació dels lípids pot ser el fil que condueix des d'un hipotètic mecanisme immunològic fins a la lesió endovascular del trofoblast i de les cèl·lules endotelials que té lloc en la preeclàmpsia.**

Els radicals lliures són espècies químiques, amb un o més electrons desaparellats, que tenen una existència independent, que difonen lliurement i que són

extremadament reactius, amb una vida mitjana de microsegons. Els radicals lliures es produeixen durant els processos normals fisiològics <sup>[224]</sup>, però la seva producció augmenta en situacions d'isquèmia, sota alguns estímuls externs i per reaccions immunes <sup>[225]</sup>, arribant a ser tòxics si la seva producció és excessiva o els mecanismes que els contrarresten no són suficients <sup>[226]</sup>.

Els neutròfils s'activen durant la resposta immune <sup>[227]</sup> i la isquèmia perllongada <sup>[225]</sup>, amb la qual cosa es multiplica la producció d'anió superòxid i peròxid d'hidrògen (radicals lliures). A més, els neutròfils activats metabolitzen l'àcid araquidònic (AA) per la via de la lipooxigenasa fins a diferents eicosanoids hidroxilats, els àcids hidroxi-eicosatetraènic (HETE), que degraden diferents components cel·lulars <sup>[227]</sup>. La via de la ciclooxigenasa del metabolisme de l'AA també és una font important de radicals lliures <sup>[225,228]</sup>. Altres fonts externes de radicals lliures són les radiacions ionitzants, el tabac i la concentració excessiva d'oxigen <sup>[226]</sup>.

**L'anió superòxid pot fer desequilibrar la balança PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>, contribuint al dèficit de PGI<sub>2</sub>, inactiva ràpidament el EDRF <sup>[229]</sup> i pot convertir els àcids grassos insaturats presents a les membranes cel·lulars en lipoperòxids, altament citotòxics per les cèl·lules. Aquests peròxids són lesius per l'endoteli i tenen un efecte trombogènic quan interactuen amb el sistema de coagulació present en el plasma <sup>[224,230]</sup>.**

Durant la gestació normal, l'activitat dels radicals lliures, i amb ells la dels lipoperòxids plasmàtics, augmenta. Aquest fet pot ser degut a un augment del *turnover* cel·lular o bé a una disminució dels mecanismes antioxidants que han de contrarrestar els radicals lliures <sup>[231]</sup>. L'activació dels lipoperòxids augmenta en relació a les setmanes de gestació i disminueix bruscament després del part. L'activació del metabolisme de l'AA dependent dels lipoperòxids pot jugar un paper important en el mecanisme de desencadenament del part <sup>[224]</sup>. L'augment dels

lipoperòxids en la gestació normal pot explicar també l'augment de les complicacions tromboembòliques [224,232].

La implicació dels radicals lliures en la preeclàmpsia va ser inicialment suggerida per la troballa de dipòsits del pigment hepatocel·lular lipofucsina a fetges de pacients amb preeclàmpsia [233]. Aquests pigments derivats dels lipoperòxids també estaven presents en concentracions elevades a placentes a terme de gestants preeclàmptiques, reflectint possiblement la implicació d'aquest òrgan en aquesta patologia [232]. En la **preeclàmpsia**, una maladaptació inicial, potser de tipus immunològic i el context isquèmic a nivell del llit vascular placentari [232], podria causar **l'activació dels neutròfils, macròfags i cèl·lules-T, amb un increment de la formació de radicals lliures i lipoperòxids** per sobre del que es dona en la gestació normal [234]. Els lipoperòxids es troben bàsicament en la fracció de lipoproteïnes d'alta densitat. Probablement, són produïts a la membrana cel·lular i transferits a aquesta fracció lipoproteica que s'encarrega de fer-la circular, donant com a resultat una lesió endotelial disseminada [235]. En la preeclàmpsia, s'ha trobat nivells elevats de radicals lliures abans de l'aparició de la clínica que es correlacionen amb els nivells de tensió arterial [231,236,237].

### **3.3.4.- Hipòtesi actual sobre l'etiopatogènia de la preeclàmpsia**

Com hem dit inicialment, el desenvolupament en el primer trimestre d'una tolerància immunològica mútua entre l'al·loempelt fetal (patern) i el teixit matern, es tradueix en importants canvis bioquímics i morfològics en la circulació sistèmica i útero-placentària. El trofoblast endovascular i l'endoteli d'aquestes noves artèries útero-placentàries produeixen prostaglandines vasodilatadores. Pot ser que altres substàncies vasodilatadores com l'EDRF estiguin també implicades. Aquests fets mantenen la **circulació útero-placentària com un sistema de baixa resistència, baixa pressió i elevada perfusió**.

En la **preeclàmpsia**, una maladaptació immunològica provocaria una **alteració en la invasió pel trofoblast** de les artèries espirals, que mantindrien l'estructura de la no-gestant i no es vasodilatarien. L'absència de trofoblast endovascular a les artèries espirals i el desequilibri entre els agents vasoconstrictors i vasodilatadors, causaria una **hipoperfusió de l'espai intervellós** que portaria a un increment de la producció de radicals lliures, produïts principalment per la decídua, que actuaria com un òrgan limfoide, amb activació dels neutròfils i altres tipus cel·lulars. Aquests radicals lliures i els lipoperòxids serien els responsables de la **lesió endotelial generalitzada**, ja que **interferirien en la fisiologia normal de l'endoteli**: inactivarien l'EDRF, interferirien en l'alliberació de l'EDRF, actuarien com a vasoconstrictors incidint directament sobre el múscul llis vascular, incrementarien els nivells d'endotelina i activarien la ciclooxigenasa, limitant a la vegada la síntesi endotelial de la PGI<sub>2</sub>, cosa que es traduiria en una dominància del TXA<sub>2</sub>.

**L'absència d'una adequada producció de PGI<sub>2</sub> i probablement de l'EDRF, faria que es desencadenés l'activació plaquetària** mediada per factors de superfície. La secreció dels grànuls plaquetaris provocaria l'agregació plaquetària i l'alliberació de substàncies agregadores i vasoconstrictores com la serotonina. La PGI<sub>2</sub> podria, a la vegada, induir l'alliberació d'angiotensina II, que intentaria millorar la perfusió placentària tot augmentant la pressió sistèmica. En aquest nou equilibri, es mantindria la perfusió placentària a costa d'un increment en la pressió arterial materna. Clínicament, aquest fet vindria representat per la hipertensió gestacional no-proteinúrica, on la morbimortalitat perinatal no està augmentada.

Per contra, en els casos de preeclàmpsia severa, l'endoteli podria estar àmpliament lesionat, essent impossible la producció de substàncies protectores de la vasoconstricció i l'agregació plaquetàries. Així doncs, en aquests casos, **la síntesi útero-placentària de PGI<sub>2</sub> com a mecanisme de rescat seria insuficient**, i juntament amb la incapacitat d'alliberament d'EDRF per l'endoteli lesionat,

portarien a un estat de vasoconstricció i activació plaquetàries i alliberació de TXA<sub>2</sub> cada cop més importants. En aquestes condicions, els estats matern i fetal aniria empitjorant d'una manera irreversible, només controlable amb la finalització de la gestació <sup>[234]</sup>.



## 4.- MODIFICACIONS DEL COMPORTAMENT PLAQUETARI EN ELS TRASTORNS HIPERTENSIVS DE L'EMBARÀS

En un treball de revisió recent, es defineix la preeclàmpsia com "un procés dependent del trofoblast mediat per una disfunció plaquetària" <sup>[238]</sup>. Encara que hi ha evidències d'un augment de l'activació plaquetària en tots els trastorns hipertensius de l'embaràs, en la preeclàmpsia és on aquestes alteracions són més evidents.

La causa inicial d'aquesta patologia és desconeguda, però una troballa característica de l'anatomia patològica és la presència de fibrina i trombus plaquetaris a la microcirculació placentària i renal <sup>[111]</sup>. En casos severos hi ha una activació plaquetària generalitzada i es desencadena la cascada de la coagulació, donant lloc fins i tot a una coagulació intravascular disseminada clínica <sup>[239]</sup>. En casos menys severos hi ha evidències d'una activació plaquetària precoç fins i tot abans de l'aparició de la clínica <sup>[240]</sup>. Aquest fet és el que ha suggerit que les plaquetes poden jugar un paper important en la fisiopatologia de la preeclàmpsia establint un **graó intermig entre la lesió endotelial i la clínica sistèmica**.

La publicació d'alguns estudis mostrant que l'administració de baixes dosis d'aspirina (que actua com a agent antiagregant), podria ser útil en la profilaxi de la preeclàmpsia, reforça aquesta hipòtesi <sup>[241-244]</sup>. Un estudi posterior amb població més àmplia demostra que l'ús d'aquest fàrmac només estaria justificat en la profilaxi del quadre en una població de risc molt seleccionada <sup>[245]</sup>.

Tot i que en la majoria dels treballs publicats i en els següents apartats, bàsicament es fa referència als quadres patològics de la hipertensió gestacional i a la preeclàmpsia, la literatura és un tant confusa en aquest punt ja que, de vegades, s'analitzen conjuntament grups de gestants amb hipertensió crònica amb o sense preeclàmpsia sobreafegida. Per altra banda, els criteris de definició dels trastorns hipertensius de l'embaràs no sempre són idèntics. Sigui com sigui, en més o menys grau, l'activació plaquetària sembla tenir un paper destacat en els trastorns hipertensius de l'embaràs.

#### 4.1.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA *in vivo* EN LA GESTACIÓ AMB TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS

- Paràmetres plaquetaris en sang perifèrica

La majoria d'autors coincideixen en una disminució del recompte plaquetari en sang perifèrica en la preeclàmpsia <sup>[12,240,246-250]</sup> i en que aquest fet pot donar-se d'una manera precoç abans de l'aparició del quadre clínic <sup>[240]</sup>. Alguns autors refereixen aquest fet també a la hipertensió induïda per l'embaràs <sup>[246,247]</sup>. Altres discrepen d'aquest fet <sup>[12]</sup>. De tota manera, encara que la **disminució en el recompte plaquetari és significatiu**, no sempre arriba a nivells de trombocitopènia, és a dir menor a  $150 \times 10^9/l$  <sup>[246]</sup>. La majoria d'estudis refereixen també un **augment en el VPM més marcat** del que es dona en la gestació normal <sup>[12,246,247,249]</sup>. En quant al PDW els resultats són contradictoris <sup>[12,249]</sup>. En general, aquests paràmetres suggereixen una reacció dels megacariòcits per contrarrestar un consum plaquetari perifèric.

- Vida mitjana de les plaquetes

Treballs que estudien la vida mitjana plaquetària pel mètode no radioisotòpic, descriuen una disminució d'aquest paràmetre en la preeclàmpsia <sup>[125]</sup>. Hi ha, però, altres estudis en **desacord** <sup>[126]</sup>, i encara altres que valoren aquest paràmetre en la hipertensió gestacional i troben que la vida mitjana només està disminuïda en aquelles gestacions que van cursar amb un retard de creixement intrauterí <sup>[251]</sup>.

- Nivells plasmàtics de proteïnes dels grànuls  $\alpha$  plaquetaris

Els nivells de  $\beta$ -tromboglobulina plasmàtica s'incrementen d'una manera més marcada en la hipertensió induïda per l'embaràs i més encara en la preeclàmpsia si ho comparem amb gestacions no complicades [127,252-254,255]. Hi ha un estudi que mostra que en la gestació complicada amb trastorns hipertensius de l'embaràs, l'augment de  $\beta$ -tromboglobulina s'acompanya d'un augment de fibrinopèptid A, a diferència del que succeeix a la gestació normal, però no hi ha correlació entre els dos paràmetres. Això fa pensar que, tot i que a les gestacions complicades existeix un increment en la generació de trombina, altres mecanismes a més a més de la trombina col·laboren en l'activació plaquetària.

No està tan clar si hi ha un augment significatiu de factor plaquetari 4 [127,254]. Donat que la  $\beta$ -tromboglobulina té una eliminació renal però no el factor plaquetari 4 [129], una disminució de la funció renal podria ser la causa d'aquest augment.

■ Metabòlits urinaris del Tromboxà A<sub>2</sub>

Està demostrat que l'excreció urinària de 2,3-dinor-tromboxà B<sub>2</sub> i 11-dehidro-tromboxà B<sub>2</sub> està **augmentada respecte a la gestació normal** [10]. Hi ha també alguna evidència que aquest fet es produeix amb anterioritat a l'aparició del quadre clínic [256]. Al contrari de la gestació normal, en què l'augment de la síntesi de tromboxà és contrarrestat per un augment paral·lel de prostaciclina [135,257], en la hipertensió gestacional la síntesi de prostaciclina està disminuïda d'una manera precoç [9]. Aquest fet, junt amb un increment en la síntesi de tromboxà que es donaria de manera més tardana en la gestació, contribuiria de manera definitiva al procés d'activació plaquetària.

Així doncs, l'increment de l'activació plaquetària que es dona en aquestes gestacions patològiques **podria resultar d'una lesió endotelial i/o d'un dèficit de prostaciclina** que actuaria sobre el comportament plaquetari, o bé per una

alteració intrínseca en la reactivitat plaquetària en la dona que desenvolupa una preeclàmpsia. Els estudis *in vitro* que s'han portat a terme intenten donar resposta a aquesta qüestió.

## **4.2.- EVIDÈNCIES DE L'ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA *in vitro* EN LA GESTACIÓ AMB TRASTORNS HIPERTENSIUS DE L'EMBARÀS**

### Estudis d'agregació plaquetària en plasma ric en plaquetes

Ja en el 1971 un treball va referir una **disminució de l'agregació plaquetària en resposta a l'ADP en la preeclàmpsia**, mentre que no es van trobar diferències entre les gestants amb hipertensió gestacional i les no-patològiques <sup>[250]</sup>. Altres treballs confirmen aquest fet <sup>[258]</sup>. Resultats similars han estat referits en resposta a altres agents agregants com l'àcid araquidònic (comparat amb gestants normals) el col·lagen i la vasopressina (comparat amb controls no-gestants) <sup>[131]</sup>.

Pel contrari, hi ha treballs que no demostren diferències en la quantitat d'ADP mínima necessària per induir l'agregació secundària <sup>[128]</sup> o en la reactivitat plaquetària en resposta al col·lagen <sup>[254]</sup>. Hi ha un estudi que, trobant l'agregació plaquetària reduïda en la gestació normal, troba que no hi ha diferències en l'agregació màxima en resposta a diferents agonistes <sup>[133]</sup>.

D'altra banda, hi ha un treball sobre la sensibilitat de les plaquetes a l'àcid araquidònic en la hipertensió induïda per l'embaràs, que estudia la mínima concentració d'àcid araquidònic necessària per formar agregats i produir la reacció d'alliberació. L'estudi conclou que, en general, les plaquetes de les gestants amb hipertensió gestacional són més sensibles a aquest agonista, i que ho són particularment les que provenen de plasmes amb un nivell d'àcid úric més alt. A més a més, aquesta sensibilitat augmentada persistia després de 6 setmanes postpart <sup>[7]</sup>.

■ Estudis d'agregació plaquetària en sang total

L'agregació espontània en sang total no està augmentada en la hipertensió gestacional <sup>[259]</sup> i quan s'utilitza un agonista com l'ADP, sembla ser que la **resposta d'agregació estaria disminuïda en la preeclàmpsia** <sup>[260]</sup>, encara que altres treballs que utilitzen diferent tècnica, refereixen que no hi ha una disminució de l'agregació entre pacients amb hipertensió gestacional i preeclàmpsia i gestants normals quan s'utilitza l'ADP. Quan es va utilitzar l'adrenalina com agonista sí que es van trobar diferències significatives entre les gestants normals i les preeclàmptiques. La mateixa tendència es va trobar entre les hipertenses gestacionals i les gestants normals i en resposta a l'agregació induïda per l'àcid araquidònic, però les diferències no van ser estadísticament significatives <sup>[261]</sup>.

■ Estudis d'alliberació plaquetària

Encara que un primer estudi **no sembla referir canvis** en l'alliberació de serotonina marcada en el PRP en resposta a l'àcid araquidònic a pacients amb trastorns hipertensius de l'embaràs, comparats amb gestants normals i controls no-gestants <sup>[7]</sup>, un altre estudi realitzat amb la mateixa tècnica amb PRP, mostra **una disminució** en pacients amb preeclàmpsia respecte a gestants normals de tercer trimestre, en l'alliberació de grànuls densos induïda per l'àcid araquidònic <sup>[138]</sup>.

A sang total, un estudi demostra que les plaquetes de gestants amb preeclàmpsia alliberen menys serotonina marcada en resposta a l'adrenalina que les gestants normals, fet que concorda amb la disminució de l'agregació induïda per aquest agonista.

■ Valoració general de la reactivitat plaquetària a través dels estudis d'agregació i alliberació

Encara que els estudis sobre el comportament plaquetari *in vitro* en la gestació complicada amb trastorns hipertensius de l'embaràs han mostrat resultats diversos, en general podríem concloure que, en conjunt, hi ha una **disminució de la reactivitat plaquetària** <sup>[131,138,250,258,260,261]</sup>. Cal dir, però, que molts d'aquests estudis estan dissenyats de manera transversal en el tercer trimestre de la gestació i que, en aquest punt, podria ser que el *pool* de plaquetes circulants fos una **població exhausta** <sup>[262]</sup>, que seria **hiporespnedora** quan s'estudiés el seu comportament *in vitro* <sup>[131]</sup>. La possibilitat de l'activació plaquetària durant la formació del PRP ha de tenir-se en compte, però els estudis en sang total mostren en general la mateixa tendència <sup>[260,261]</sup>. Si la disminució de la capacitat de resposta de les plaquetes *in vitro* és producte de la seva activació *in vivo*, els estudis *in vitro* en plaquetes de gestants amb preeclàmpsia severa, no aportaran dades sobre si la importància de l'alteració en la reactivitat intrínseca de les plaquetes contribueix de manera definitiva a la fisiopatologia de la preeclàmpsia. En aquest sentit, l'estudi de plaquetes menys activades, com en la hipertensió gestacional, podria ser de més ajuda <sup>[7]</sup>.

■ Estudis sobre la producció de tromboxà  $A_2$  *in vitro*

Els resultats dels treballs que estudien la producció plaquetària de tromboxà  $A_2$  *in vitro* a la gestació complicada amb trastorns hipertensius de l'embaràs són, com en la gestació normal, **contradictoris**. Un treball que evalua la reactivitat plaquetària mitjançant la mesura del malondialdehid després de l'estimulació amb trombina, mostra un augment en la síntesi d'aquest compost en les pacients amb hipertensió gestacional, però només quan aquesta va acompanyada de retard del creixement intrauterí <sup>[251]</sup>. En canvi, altres treballs no troben diferències en els



nivells de tromboxà B<sub>2</sub> sèric de dones preeclàmptiques o amb hipertensió gestacional si es comparen amb gestants normals de tercer trimestre <sup>[126,138,261]</sup>.

■ Estudis de sensibilitat plaquetària a agents inhibidors del seu comportament

De la mateixa manera com hem vist en la gestació normal, on les plaquetes de dones gestants amb trastorns hipertensius de l'embaràs mostren, respecte a pacients no-gestants, **una sensibilitat disminuïda als inhibidors de la reactivitat plaquetària que actuen per la via de l'AMPC**, incloent la prostaciclina i els seus anàlegs estables, la PGD<sub>2</sub> i els inhibidors de la tromboxàsintetassa <sup>[7,138,141-143]</sup>. **Si hi ha o no diferències entre la gestació normal i la complicada amb THE, és un fet controvertit a la literatura:** mentre que hi ha treballs que conclouen que la reducció en la sensibilitat a la prostaciclina és més marcada en les plaquetes de gestants preeclàmptiques que en les de les normals <sup>[141,142]</sup>, altres estudis no objectiven aquestes diferències <sup>[138]</sup>.

■ Els segons missatgers en la gestació: el paper del calci intracel·lular i l'AMPC.

Com en el cas de la gestació normal, aquests dos segons missatgers són els que s'han estudiat en la gestació amb trastorns hipertensius de l'embaràs.

**Els resultats sobre les variacions de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> són contradictoris.** Un primer estudi sobre el calci intracel·lular marcat amb quin-2, no va mostrar cap diferència en els nivells de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> basals o després de l'estimulació amb ADP entre gestants hipertenses i normals. Sí hi havia però, una disminució de les [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> després de l'estimulació amb serotonina <sup>[19]</sup>. L'explicació que donen els autors per aquestes diferències és una coneguda facilitat de supressió de la resposta plaquetària a la serotonina quan hi ha hagut activació prèvia <sup>[263]</sup>. Altres estudis posteriors sí que demostren un augment de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> basals en dones amb preeclàmptia, molt per sobre de les observades en gestacions normals <sup>[18,21]</sup>, però

no en dones amb hipertensió gestacional <sup>[18]</sup>. Malgrat aquestes conclusions, no podem saber si l'augment en la  $[Ca^{2+}]_i$  és per sí mateixa la causa de l'augment de la reactivitat plaquetària o la conseqüència d'una població plaquetària activada. En aquest sentit, un treball recent mostra que les alteracions en la  $[Ca^{2+}]_i$  precedeixen a l'aparició de la clínica: l'estudi, que és prospectiu i amb pacients primigestes amb risc de patir trastorns hipertensius de l'embaràs, mostra que les pacients que desenvoluparan preeclàmpsia tenen un nivell de  $[Ca^{2+}]_i$  postestimulació amb arginina-vasopressina més elevat que les gestants normals ja en el primer trimestre, mentre que la  $[Ca^{2+}]_i$  basal no estava augmentada <sup>[20]</sup>.

En quant a l'AMPc, un estudi transversal demostra una **disminució en la síntesi d'AMPc postestimulació** en les plaquetes de gestants amb trastorns hipertensius de l'embaràs, de manera **similar al que trobàvem en la gestació normal**. Encara que aquest efecte va ser discretament més marcat en el grup d'hipertenses, les diferències no van ser significatives <sup>[138,144]</sup>.

Per tant, si a la preeclàmpsia hi ha un dèficit relatiu de prostaciclina, i a més li sumem el fet que la plaqueta és menys sensible a aquesta prostaciclina, això podria desencadenar una major activació plaquetària *in vivo* que en la gestació normal, on la síntesi de prostaciclina està augmentada de manera fisiològica.

■ L'angiotensina II i les plaquetes en la preeclàmpsia: la connexió amb el sistema renina-angiotensina-aldosterona

Encara que no és l'objectiu d'aquesta tesi descriure ni estudiar les modificacions del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) en la gestació normal i complicada pels trastorns hipertensius de l'embaràs, que són moltes, variades i importants, cal fer referència de manera breu a alguns estudis que s'han portat a terme sobre els receptors de l'angiotensina II a nivell plaquetari. L'objectiu d'aquests estudis és descriure el paper del RAAS en la preeclàmpsia utilitzant la

plaqueta com a model de la cèl·lula muscular llisa. La relevància d'aquest RAAS sobre els receptors de l'angiotensina II, i a la vegada, sobre l'hemostàsia primària, encara ha de ser avaluada.

Com ja va demostrar Abdul-Karim el 1961 <sup>[3]</sup>, en la gestació normal hi ha una resistència a l'efecte vasopressor de l'angiotensina II. En les gestacions que presentaran el quadre clínic de preeclàmpsia, hi ha una "normalització" d'aquest efecte vasopressor en èpoques molt precoces de la gestació <sup>[4,200]</sup>. El test de resposta a la infusió de l'angiotensina es podria utilitzar com a test predictiu de l'aparició de preeclàmpsia, si no fos perquè la seva complexitat impedeix d'implementar-lo de forma generalitzada.

En aquesta línia, un treball ha demostrat que les plaquetes de gestants normals tenen disminuïda la capacitat d'unir-se a l'angiotensina II, i que les plaquetes de preeclàmptiques recuperen d'una manera "anormal" aquesta capacitat fins al nivell de les no-gestants <sup>[264]</sup>. Aquest test *in vitro* seria molt més fàcil de realitzar que el test d'infusió *in vivo*, i es podria aplicar de manera àmplia en una població seleccionada susceptible de patir trastorns hipertensius de l'embaràs; si aquests resultats es confirmen d'una manera definitiva tindríem, doncs, la capacitat d'estudiar a través de les plaquetes, el que està succeïnt al múscul llis vascular.

Per altra banda, es creu que l'angiotensina II té un paper important en l'activació plaquetària, ja que hi ha un estudi que refereix un augment en els nivells de  $[Ca^{2+}]_i$  després de l'estimulació d'angiotensina II *in vitro*, i aquest increment és més important quan es tracta de pacients amb preeclàmpsia <sup>[21]</sup>. Aquest fet concordaria amb la troballa abans referida, d'una resposta augmentada en la preeclàmpsia, dels nivells de  $[Ca^{2+}]_i$  després de l'estimulació amb l'agent vasopressor arginina-vasopressina <sup>[20]</sup>.

\* \* \* \* \*

En resum, doncs, i com a conclusió d'aquesta revisió, veiem que hi ha evidències de l'augment de l'activitat plaquetària *in vivo* en la gestació normal i en els trastorns hipertensius de l'embaràs. El moment en el qual té lloc aquesta activació i quin paper té en el desenvolupament fisiopatològic d'aquests trastorns encara està per definir, tot i que també resulta bastant clar que aquesta activació tindria lloc com a resposta a una lesió endotelial més o menys generalitzada.

S'acaba així aquesta revisió bibliogràfica, esperant que el lector pugui, d'entre tota aquesta informació, teure'n una visió global sobre el complex tema del comportament plaquetari i la gestació, tant si aquesta es desenvolupa d'una manera normal, com quan es complica amb els trastorns hipertensius de l'embaràs.

\* \* \* \* \*

## **HIPÒTESIS DE TREBALL**



El treball experimental que és el nucli d'aquesta tesi ha estat elaborat amb els coneixements actuals que es té sobre el comportament plaquetari, descrits a la revisió bibliogràfica. Es basa en les següents hipòtesis:

1. En la gestació normal hi ha un augment de la reactivitat plaquetària. Aquest augment ens és possible demostrar-lo mitjançant els tests:
  1. **Test de sensibilitat a la PGE<sub>1</sub> en l'agregació induïda per l'àcid araquidònic**
  2. **Calci intracel·lular basal i postestimulació amb trombina i vasopressina**
2. En els trastorns hipertensius de l'embaràs, aquest augment de reactivitat plaquetària és més marcat, per sobre del que succeeix en la gestació normal.
3. L'augment de la reactivitat plaquetària en els trastorns hipertensius de l'embaràs es pot detectar d'una manera precoç, amb aquests tests, al primer o segon trimestre, donat que la fisiopatologia del procés ja està desencadenada.

\* \* \* \* \*





**OBJECTIUS**



1. Establir una cronologia o perfil de comportament plaquetari en el decurs de l'embaràs en la dona gestant sense patologia (intervalls de referència segons edat gestacional).

Cronologia en la resposta al test de sensibilitat a la PGE<sub>1</sub>

Cronologia de les modificacions en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

2. Establir una cronologia o perfil de comportament plaquetari en el decurs de l'embaràs en la dona gestant amb trastorns hipertensius de l'embaràs (segons edat gestacional).

Cronologia en la resposta al test de sensibilitat a la PGE<sub>1</sub>

Cronologia de les modificacions en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

3. Comparar els dos perfils (gestació normal-gestació amb THE) per establir si hi ha diferències significatives en els tests descrits entre els dos grups de gestants.
4. Establir en quin moment cronològic de la gestació amb THE es presenten les modificacions del comportament plaquetari detectades per ambdós mètodes experimentals.
5. Desenvolupar un test de laboratori de relativa simplicitat que sigui útil per demostrar diferències en el comportament plaquetari entre els diferents grups d'estudi.
6. Calcular el valor predictiu ajustat que pot tenir aquest test en el primer o segon trimestre aplicat a la població gestant, per detectar la pacient amb risc de patir algun dels trastorns hipertensius de l'embaràs.

\* \* \* \* \*



# **MATERIAL i MÈTODES**



## 1.- PACIENTS

Les pacients han estat reclutades en la Consulta Externa d'Obstetrícia de l'Hospital Clínic de Barcelona o en la Unitat d'Hospitalització del mateix hospital quan la pacient estava ingressada per algun motiu. A totes les pacients incloses a l'estudi, se'ls ha sol·licitat per escrit la seva participació, prèvia explicació detallada dels motius i objectius del mateix. Van signar un full de consentiment que estava redactat en català a l'anvers i castellà al revers. Cada pacient disposava d'una tarja identificativa de la seva pertinença a l'estudi, que presentava a cada visita.

Les pacients amb trastorns hipertensius de l'embaràs (THE) estan classificades segons els criteris de Davey i MacGillivray i la *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)* segons consta a l'apartat "3.2.- Concepte i classificació" de la revisió bibliogràfica.

S'ha estudiat un total de 94 pacients repartides en els següents grups:

GRUP A1: Gestants amb hipertensió gestacional

GRUP A3: Gestants amb preeclàmpsia

GRUP B1: Gestants amb hipertensió crònica

GRUP B3: Gestants amb hipertensió crònica amb preeclàmpsia sobreafegida

GRUP CC: Gestants sense patologia

GRUP NG: Controls no-gestants

## 1.1.- ESTUDI LONGITUDINAL

Estudi longitudinal de les 30 pacients gestants normals corresponents al grup 5:

- a) que acomplissin els criteris d'inclusió establerts
- b) de les quals poguéssim obtenir dades de manera seqüencial en els moments que s'indiquen

Van entrar en protocol totes les primeres visites del Dispensari d'Obstetrícia que acomplien aquests criteris fins tenir les dades complertes d'aquestes 30 pacients.

Per cada una de les pacients es va complir un dossier que incloïa:

- a) full de recollida de dades generals
- b) fulls de control de cada trimestre
- c) full de resultats de les variables

### Criteris d'inclusió:

- gestants primigràvides
- fetus únic
- raça blanca
- sense història prèvia personal de trastorns hipertensius, malaltia renal, diabetis mellitus, hiperlipèmia o insuficiència hepàtica
- 1er control gestacional inferior a les 15 setmanes
- Tensió arterial diastòlica abans de les 20 setmanes i a les 6 setmanes postpart menor a 90
- no medicació durant la gestació excepte complexos vitamínics o ferro
- no ingesta de fàrmacs que alterin el funcionament plaquetari 10 dies abans d'iniciar el protocol.



Criteris d'exclusió:

- recompte plaquetari < 90.000
- pacients que en el decurs de la gestació presentin clínica compatible amb qualsevol de les categories dels trastorns hipertensius de l'embaràs
- pacients que per qualsevol patologia hagin de rebre medicació de tipus AINE (antiinflamatoris no esteroidals) o altres fàrmacs que afectin el funcionament plaquetari o transfusions, dins dels 10 dies previs a les determinacions.

## 1.2.- ESTUDI TRANSVERSAL

Estudi transversal de 44 gestants amb qualsevol dels tipus dels trastorns hipertensius de l'embaràs, les característiques de les quals van ser:

### Criteris d'inclusió:

- presentar qualsevol dels trastorns hipertensius de l'embaràs segons els criteris descrits per Davey i MacGillivray i acceptats per la *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)*

### Criteris d'exclusió:

- recompte plaquetari < 90.000
- pacients que per qualsevol patologia hagin de rebre medicació de tipus AINE o altres fàrmacs que afectin el funcionament plaquetari o transfusions, dins dels 10 dies previs a les determinacions.

De la mateixa manera que amb el grup longitudinal, per cada una de les pacients del grup transversal es va complimentar un dossier que va incloure:

- a) un full de recollida de dades generals
- b) fulls de control de cada un dels trimestres
- c) full de resultats de les variables

## 2.- DISSENY DE L'ESTUDI

Es tracta d'un estudi **experimental i prospectiu** que inclou dos grups de pacients en estudi:

### GRUP LONGITUDINAL:

30 gestants que s'han inclòs a l'estudi longitudinal i destinades a descriure el perfil de la reactivitat plaquetària en la gestació normal. A aquest grup de pacients s'ha realitzat l'estudi plaquetari:

- al 1er trimestre < 15 setmanes
- al 2on trimestre, entre les 26 i 28 st
- al 3er trimestre, entre les 34 i 36 st
- entre les 6 i 12 setmanes postpart.

### GRUP TRANSVERSAL:

Gestants que s'han inclòs a l'estudi transversal de la gestació i destinades a descriure el perfil de la reactivitat plaquetària en la gestació complicada amb THE. A aquest grup de pacients s'ha realitzat l'estudi plaquetari:

- al 1er trimestre < 15 setmanes
- al 2on trimestre entre les 26 i 32 st
- al 3er trimestre  $\geq$  33 setmanes
- entre les 6 i 12 setmanes postpart.

A les pacients d'aquest grup no sempre ha estat possible fer l'estudi experimental en el primer i segon trimestres, ja que eren remeses al nostre centre des d'altres centres mèdics o hospitalaris, quan ja havia debutat el quadre clínic. Aquest fet es donava majorment al tercer trimestre, encara que en alguns casos de trastorns hipertensius greus podem tenir dades de finals del segon trimestre. Només en el

cas de les pacients hipertenses cròniques que es van controlar des de l'inici de la gestació en el nostre centre, podem tenir dades sobre un moment més precoç de l'embaràs.

### 3.- MATERIAL

#### 3.1.- TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE<sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC

##### 3.1.1.- MATERIAL NECESSARI

- 10 cc de sang recollida de manera no traumàtica de la vena antecubital en un tub de CPD: citrat trisòdic al 3.5%
- Plasma ric en plaquetes obtingut de l'anterior per centrifugació amb centrífuga Sorvall T6000B Centrifuge (Dupont).
- Prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 1 mg de Sigma (St Louis, MO, USA). Ref. No. P-5515.
- Àcid araquidònic (AA) 5mg/mL de Bio-Data (Hatboro, PA, USA). Ref. No. 101297.
- Mesura de l'agregació mitjançant agregòmetre Aggrecoeder PA-3210 (Menarini).

##### 3.1.2.- PREPARACIÓ DE LA PGE<sub>1</sub>

- 1) Al vial de 1 mg de PGE<sub>1</sub> afegir 1 ml de la solució de 30% H<sub>2</sub>O + 70% etanol = STOCK 1 = Concentració 1 mg/mL
- 2) Diluir a 1/10 l'STOCK 1 amb la solució d'H<sub>2</sub>O i etanol = STOCK 2 = Concentració 100 mg/L

Aquesta és la concentració que es guarda congelada i en fosc en alíquotes de 10 µl cada una.

3) Dilucions de treball inicials:

(A) Dilució 1/40 de STOCK 2 = Concentració 2.5 mg PGE<sub>1</sub>/L

(B) Dilució 1/100 de STOCK 2 = " 1 mg PGE<sub>1</sub>/L

(C) Dilució 1/400 de STOCK 2 = " 0.25 mg PGE<sub>1</sub>/L

Totes les solucions seran preparades amb sèrum fisiològic: la dissolució (A) amb els 10 µl de l'alíquota amb STOCK 2 + 390 µl de NaCl, la dissolució (B) amb 200 µl de la dissolució (A) + 300 µl de NaCl i la dissolució (C) amb 50 µl de la dissolució (B) + 150 µl de NaCl.

### **3.1.3.- PREPARACIÓ DEL PLASMA RIC EN PLAQUETES**

- 1) Extracció no traumàtica de 10 ml de sang amb solució anticoagulant (citrats trisòdic 3.5%).
- 2) Passar-la a tubs de 5 ml.
- 3) Centrifugar durant 10 min a 1200 rpm amb centrífuga Sorvall T6000B Centrifuge (Dupont).
- 4) Extracció acurada del sobrenedant = Plasma ric en plaquetes (PRP)

### 3.2.- Calci intracel·lular basal i postestimulació amb trombina o vasopressina

#### 3.2.1.- MATERIAL NECESSARI

- 10 cc de sang recollida de manera no traumàtica de la vena antecubital en un tub de CPD:citrat trisòdic al 3.5%.
- Plasma ric en plaquetes obtingut de l'anterior per centrifugació amb centrifuga Sorvall T6000B Centrifuge (Dupont).
- Comptador *coulter* de plaquetes Technikon H-1 System (Technikon Instruments Corp., Tarrytown, NY, USA).
- Fura 2/AM pentacetoxymethyl ester (Fura-2) 1 mg de Calbiochem (La Jolla, Ca, USA). Ref. No 344905.
- Dimetil sulfòxid (DMSO) 100 cc de Sigma (St Louis, MO, USA). Ref. No. D-5879.
- Trombina humana 10 NIH unitats/vial de Sigma (St Louis, MO, USA) . Ref. No. T-9010.
- Arginina-Vasopressina 1 mg de Sigma (St Louis, MO, USA). Ref. No. V-9872.
- CCD + adenosina + teofilina
- Tampó HEPES pH 7.4 a 37°C elaborat amb: HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) 1 mM, Glucosa 6 mM i Albúmina sèrica humana 0.2 mg/mL.
- CaCl<sub>2</sub> 1mM.
- Digitonina 50 µM, EGTA 6 mM, TRIS 20 mM.
- Cubetes de quars de 3 ml per lectura de la fluorescència.
- Mesura de la fluorescència mitjançant l'espectrofluoròmetre model Hitachi F-2000 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan).

Les concentracions expressades són concentracions finals. Dels reactius no especificats l'HEPES, l'albumina sèrica humana, la digitonina, l'EGTA i el TRIS, l'adenosina i la teofilina són de Sigma (St. Louis, MO, USA); la resta són de Merck (Darmstadt, Germany).

### **3.2.2.- PREPARACIÓ DE LA FURA-AM**

- 1) Resuspendre el vial de fura-2 en 1 ml cloroform.
- 2) Repartir-lo en alíquotes de 50 µl (que contenen 50µg de fura-2).
- 3) Dessecar les alíquotes amb N<sub>2</sub>.
- 4) Guardar a -20°C i en fosc fins al seu ús.
- 5) Per la seva utilització, resuspendre l'alíquota en 100µl de DMSO per obtenir una concentració de fura2 500µM.

### **3.2.3.- PREPARACIÓ DEL PLASMA RIC EN PLAQUETES**

- 1) Extracció no traumàtica de 10 ml de sang amb solució anticoagulant (citrat trisòdic 3.5%).
- 2) Passar-la a tubs de 5 ml.
- 3) Centrifugar durant 10 min a 1200 rpm
- 4) Extracció acurada del sobrenedant = Plasma ric en plaquetes (PRP)



## 4.- MÈTODES

### 4.1.- OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

L'obtenció i processament de les mostres s'ha fet de manera íntegra a l'Hospital Clínic de Barcelona. Les extraccions es van fer de manera rutinària en el Servei d'Extraccions a pacients que provenien de la Consulta Externa d'Obstetrícia i a la Unitat d'Hospitalització d'Obstetrícia quan la pacient estava ingressada. L'extracció de sang per realitzar els dos mètodes experimentals es va realitzar de manera acurada i no traumàtica, per evitar l'activació plaquetària, mitjançant punció de la vena antecubital, amb una xeringa de polipropilè i agulla del número 21. La sang es va dipositar de manera immediata en un tub amb l'anticoagulant citrat trisòdic al 3.8% en proporció v/v 9:1. El volum total necessari per realitzar les dues tècniques experimentals va ser de 20 cc. Dins de la primera hora postextracció els tubs van ser portats al Laboratori d'Hemocoagulació on es va iniciar el processament de les mostres. Per la lectura mitjançant fluorescència de la  $[Ca^{2+}]_i$ , les mostres es van acabar de processar en el Laboratori d'Hormonologia. Es va tenir cura de realitzar la lectura de fluorescència dins de les 3 h. postextracció, donat que està demostrat que els nivells de calci basal augmenten després d'aquest període de temps.

Totes les determinacions es van realitzar per duplicat. En cas de divergència en els resultats, es va tornar a realitzar el test.

Juntament amb cada una de les extraccions de sang per realitzar els dos mètodes experimentals es va fer una extracció de sang i una recollida d'orina de 24 hores,

per realitzar determinacions d'hemograma i bioquímica renal i hepàtica rutinàries a través del Laboratori Central del nostre Hospital. Prèviament a les extraccions, es va determinar la tensió arterial sistòlica i diastòlica en sedestació mitjançant un esfigmomanòmetre de mercuri convencional. La tensió arterial que s'ha prè per l'estudi és la mitjana de 3 mesures separades 5 minuts cada una.

## 4.2.- TEST DE SENSIBILITAT A LA PGE<sub>1</sub> EN L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA INDUÏDA PER L'ÀCID ARAQUIDÒNIC

### 4.2.1.- BASES DELS ESTUDIS SOBRE L'AGREGACIÓ PLAQUETÀRIA

L'estudi de l'agregació plaquetària s'ha portat a terme mitjançant el mètode turbidomètric de Born <sup>[265]</sup>. Aquest mètode es basa en la possibilitat de mesurar variacions de la intensitat de la llum transmesa a través d'un plasma ric en plaquetes (PRP) o d'una suspensió de plaquetes en un tampó adequat. Després de l'addició d'agents inductors de l'agregació, les plaquetes agreguen entre sí, fet que es tradueix en un augment de la llum transmesa a través de la cubeta de l'agregòmetre. Els canvis de transmissió de la llum al llarg del temps poden registrar-se en una gràfica.

Per la realització dels estudis d'agregació, 450 µl de PRP són dipositats a les cubetes de l'agregòmetre, sotmeses a constant agitació i a temperatura de 37°C i s'afegeix 50µl de l'agent inductor de l'agregació, mantenint la incubació durant 5 minuts.

Els inductors de l'agregació que s'utilitzen habitualment per explorar el comportament plaquetari són l'àcid araquidònic (AA) 1.6 mM, ADP 4 µM i 2 µM, epinefrina 10 µM, col·lagen 5µg/mL i ristocetina 1 mg/mL. L'ADP a dosis elevades és molt potent i indueix directament l'agregació plaquetària, mentre que la trombina, l'epinefrina o el col·lagen ho fan de forma indirecta, provocant l'alliberació de l'ADP intraplaquetari. L'àcid araquidònic indueix l'agregació a través de la formació de tromboxà A<sub>2</sub>.

Els estudis d'agregació enfront diversos estímuls permeten valorar les diferents funcions plaquetàries. Així, l'agregació induïda pel col·lagen determina la capacitat

de les plaquetes d'adherir-se al col·lagen i produir la reacció d'alliberació. L'agregació induïda per l'ADP posa a prova la funció cohesiva de la glicoproteïna IIb-IIIa. L'agregació desencadenada per l'àcid araquidònic reflexa principalment la funció de la ciclooxigenasa plaquetària i la tromboxàsintetasa, mentre que l'agregació induïda per la ristocetina tradueix *in vitro* la capacitat de la plaqueta d'adherir-se a l'endoteli.

Cal dir, però, que aquestes proves són més qualitatives que quantitatives, ja que el mètode és un tant groller i té limitacions en la definició de concentracions intermitges capaces de desencadenar l'agregació.

#### **4.2.2.- PROCEDIMENT**

Incubació durant 5 min. del PRP + PGE<sub>1</sub> a 37°C en tots els casos. En posar l'àcid araquidònic (AA) s'inicia l'agregació:

1. Agregació basal patró utilitzant AA 1.6 µM de concentració final:  
AA 25 µl + PRP 225 µl
  
2. Agregacions experimentals: afegir al PRP els volums de les diferents dissolucions:
  - a) 10 µl de dissolució (A)= 25 ng PGE<sub>1</sub> (100 ng/mL de concentració final)
  - b) 10 µl de dissolució (B)= 10 ng PGE<sub>1</sub> (40 ng/mL de concentració final)
  - c) 10 µl de dissolució (C)= 2.5 ng PGE<sub>1</sub> (10 ng/mL de concentració final)

Es determinarà la **quantitat mínima de PGE<sub>1</sub> capaç d'inhibir** l'agregació que serà la variable que recollirem. Es considerarà que l'agregació està inhibida quan sigui inferior al 20% als 5 minuts.

La quantitat de  $PGE_1$  necessària per inhibir l'agregació plaquetària induïda per àcid araquidònic ens donarà la mida de la tendència a l'agregació del plasma en estudi: contra més quantitat de  $PGE_1$  sigui necessària, més tendència a l'agregació tindrà el plasma.

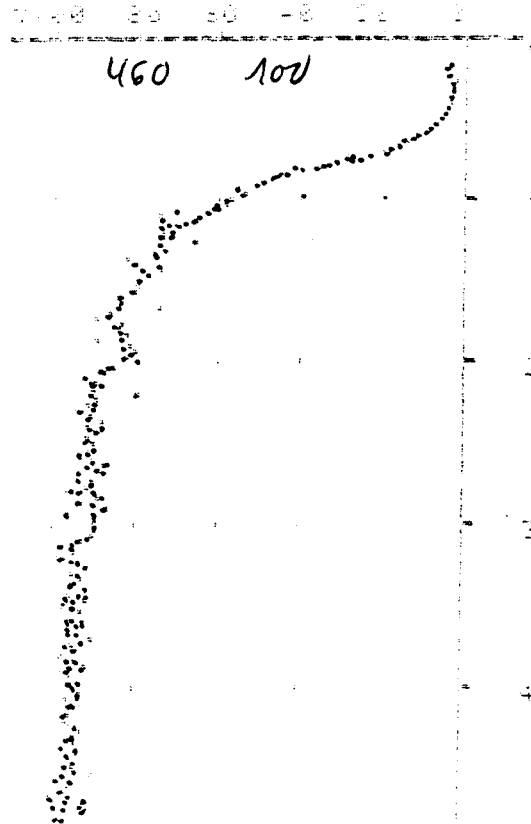


Figura 1. Exemple d'agregació plaquetària induïda per àcid araquidònic

### 4.3.- CALCI INTRACEL·LULAR BASAL I POSTESTIMULACIÓ AMB TROMBINA O VASOPRESSINA

#### 4.3.1.- BASES DE LA MEDICIÓ DE LA $[Ca^{2+}]_i$

Degut a la considerable sensibilitat de detecció dels compostos fluorescents comparats als que simplement absorbeixen la llum, els esforços més importants en els últims anys s'han centrat en l'aplicació de marcadors fluorescents per mesurar la  $[Ca^{2+}]_i$ . Actualment és possible sintetitzar un compost que en unir-se al  $Ca^{2+}$  augmenti la capacitat de fluorescència, o bé que pateixi un desplaçament en l'espectre d'emissió o d'excitació.

El mètode de la fluorimetria es basa en la propietat que tenen la majoria de molècules, que després d'absorbir un fotó, l'electró excitat retorni al seu estat basal perdent energia gradualment per una sèrie de colisions de la molècula del marcador amb altres molècules del medi.

El 1980, Tsien va unir una metoxiquinolona fluorescent a un ester d'un quelant de  $Ca^{2+}$ , l'EGTA i així va idear un marcador realment sensible per mesurar la  $[Ca^{2+}]_i$ ; es va anomenar quin2 <sup>[266]</sup>. Un dels grans avantatges del quin2/AM (l'ester tetracetoximetílic) és que, per les seves característiques, penetra lliurament a l'interior de la cèl·lula a través de la membrana plasmàtica sense manipulació. Un cop dins de la cèl·lula, les esterasses citosòliques hidrolitzen el grup AM, generant el compost lliure quin2, que és relativament impermeable a les membranes i que, per tant, queda retingut a dins de la cèl·lula. Un altre avantatge és que no es destrueix per la unió amb el  $Ca^{2+}$  com altres marcadors.

El quin2 també té alguns inconvenients que han estat en part solventats per la nova generació de marcadors fluorescents de  $Ca^{2+}$  intracel·lular com el fura2 i

l'indo1<sup>[267]</sup>, també disponibles en forma AM. Un dels principals avantatges d'aquests marcadors és la seva elevada fluorescència, unes 30 vegades superior a la del quin2, la qual cosa permet la seva utilització en concentracions molt inferiors, minimitzant notablement l'efecte tampó sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. L'altre gran avantatge és que la unió amb el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular provoca, a més a més d'un augment d'intensitat de fluorescència, un desplaçament en els espectres. Això fa que es pugui calcular la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  independentment de la concentració total del marcador, de la longitud del recorregut de l'ona i de la sensibilitat de l'aparell.

En l'espectre d'excitació de fura2 saturat de  $\text{Ca}^{2+}$  (afegint primer digitonina per lissar les plaquetes en presència de  $\text{CaCl}_2$  al medi per saturar de  $\text{Ca}^{2+}$  el marcador) i de fura2 lliure (afegint EGTA i Tris per quelar el  $\text{Ca}^{2+}$ ) s'observa que la màxima sensibilitat de l'espectre s'obté agafant longituds d'ona de 340 i 380 nm. La fluorescència d'emissió es recull a 510 nm. Aquests són els paràmetres que s'han utilitzat en la medició de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en aquesta tesi.

Altres avantatges addicionals del fura2 sobre el quin2 són la menor afinitat pel  $\text{Ca}^{2+}$ , que és molt selectiu pel  $\text{Ca}^{2+}$  enfront d'altres cations divalents com el  $\text{Mg}^{2+}$ , el  $\text{Mn}^{2+}$  i el  $\text{Zn}^{2+}$ , i a més a més el fura2 és relativament resistent a la fotolesió i al blanqueig. La introducció del fura2 ha suposat una gran millora en la tècnica de mesurar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pràcticament en qualsevol tipus de cèl·lula, i ha contribuït enormement a la determinació acurada de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , permetent avenços considerables en el coneixement de la fisiologia i la fisiopatologia del metabolisme intracel·lular del  $\text{Ca}^{2+}$  en molts camps de la medicina.

#### **4.3.2.- RENTAT DE PLAQUETES PER CENTRIFUGACIÓ**

Un mètode ideal d'aïllament de plaquetes és aquell que evita l'activació plaquetària i proporciona una suspensió de cèl·lules que responen a l'estimulació d'una manera similar a com responen *in vivo*. Tal com passa en altres cèl·lules, les plaquetes mantenen millor les seves funcions en medis semblants als medis de cultiu cel·lular. Proteïnes protectores com l'albumina preveuen l'adhesió de les plaquetes a les parets dels tubs i contenidors, i minimitzen la probabilitat d'activació durant l'aïllament i el maneig. Una font d'energia com la glucosa és essencial, i el pH ha de ser com el pH del plasma (7.35-7.45). La sang ha de ser recollida en una solució anticoagulant. La solució d'àcid cítric, citrat i dextrosa, utilitzada en aquesta tesi té l'avantatge, no només de quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  de la sang, evitant l'activació de la coagulació, sinó també de baixar el pH de la mostra a 6.5, pH en el qual les plaquetes no s'activen. Els avantatges del mètode d'obtenció de plaquetes per centrifugació són que es poden manejar grans volums de sang, que el recompte plaquetari es pot ajustar al número desitjat i que les plaquetes responen als activadors i mantenen aquesta capacitat de resposta durant hores. Estudis de microscopia electrònica han demostrat que la morfologia plaquetària després de centrifugació i resuspensió és similar a la de quan estan en el plasma <sup>[268]</sup>. El principal problema és que en condicions ideals, requereix la presència d'una sèrie de substàncies per prevenir l'activació plaquetària com són la hirudina, l'apirasa, la  $\text{PGE}_1$  i l'EDTA, que poden tenir efectes importants en el funcionalisme plaquetari i que s'ha demostrat que poden emmascarar les alteracions potencials de les plaquetes en determinades situacions patològiques com ara la hipertensió arterial. Aquest problema queda resolt amb el rentat de plaquetes amb CCD i per centrifugació i final resuspensió amb un tampó adient (HEPES en el cas del treball que aquí es presenta) donant lloc a una suspensió de plaquetes que no mostren activació i que mantenen la seva resposta a diferents activadors, com l'ADP i l'adrenalina durant hores i de manera similar a plaquetes suspeses en plasma (plasma ric en plaquetes).



#### 4.3.3.- PROCEDIMENT

1. Obtenció de plasma ric en plaquetes PRP de la manera prèviament descrita en el punt 3.2.3.
2. Afegir CCD + Adenosina + Teofilina (CCD-A-T) i obtenció d'un *pellet* de plaquetes per centrifugació a 2000-3000 rpm durant 20'.
3. Resuspensió del *pellet* en HEPES i ajust del recompte plaquetari a  $2-2.5 \times 10^8$  plq/mL.
4. Incubació de la suspensió de plaquetes amb fura2  $2 \mu\text{M}$  de concentració final durant 35 minuts en un bany de  $37^\circ\text{C}$  amb agitació contínua. A partir d'aquest moment, les mostres estaran protegides de la llum.
5. Rentat per centrifugació amb CCD-A-T 20 minuts a 2.000-3.000 rpm dues vegades per l'eliminació de la porció extracel·lular de l'indicador fura2.
6. Resuspensió del *pellet* en tampó HEPES, fins aconseguir una concentració final de plaquetes de  $0.5 \times 10^8$  plq/mL comprovada amb un *coulter* automàtic.
7. Ajustar el  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lular amb  $\text{CaCl}_2$  1 mM per replecionar els dipòsits intracel·lulars de  $\text{Ca}^{2+}$ .
8. Incubació de la suspensió 15 min a  $37^\circ\text{C}$  en agitació contínua per recuperar la funció plaquetària després del rentat.

9. Obtenció del senyal de fluorescència utilitzant longituds d'ona d'excitació de 340 i 380 nm i ona fixa d'emissió de 510 nm segons el següent procediment: 1) Omplir la cubeta de quars de 2 ml de suspensió de plaquetes i mantenir-la en agitació contínua. 2) Iniciar la lectura i als 100 seg afegir l'agonista (trombina o vasopressina), als 200 seg afegir digitonina 50  $\mu\text{M}$  per lliurar les plaquetes (espectre saturat de  $\text{Ca}^{2+}$ ) i als 350 seg afegir EGTA 6mM + Tris 20 mM per quelar el calci (espectre de fura2 lliure on hi ha 0  $\text{Ca}^{2+}$ ) i ajustar el pH de la cubeta a 8.3. Finalitzar la lectura als 500 seg.
10. Càlcul de: 1) l'autofluorescència d'una mostra de suspensió de plaquetes sense marcador fura2, 2) la fluorescència de plaquetes marcades amb fura2 en condicions basals i després d'afegir Trombina 0.1 U/mL i 3) la fluorescència després d'afegir Arginina-Vasopressina 1nM. Pel càlcul de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  utilitzarem l'equació:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\text{mín}}) / (R_{\text{màx}} - R) \times Sf_2 / Sb_2$$

on R és el quocient de les intensitats de fluorescència de l'indicador a longituds d'ona de 340 i 380 nm, característics de l'indicador lliure i saturat per calci respectivament. Aquest quocient canvia en el mateix sentit que la concentració de calci citosòlic.  $R_{\text{mín}}$  i  $R_{\text{màx}}$  representen els quocients per les formes lliures i lligades respectivament.  $R_{\text{màx}}$  s'obté amb digitonina 50  $\mu\text{M}$ , i  $R_{\text{màx}}$  s'obté amb EGTA 6 mM + Tris 20 mM.  $Sf_2$  i  $Sb_2$  representen les intensitats de fluorescència de cada forma a 380 nm.  $K_d$  és la constant de dissociació a 224 nmol/l.

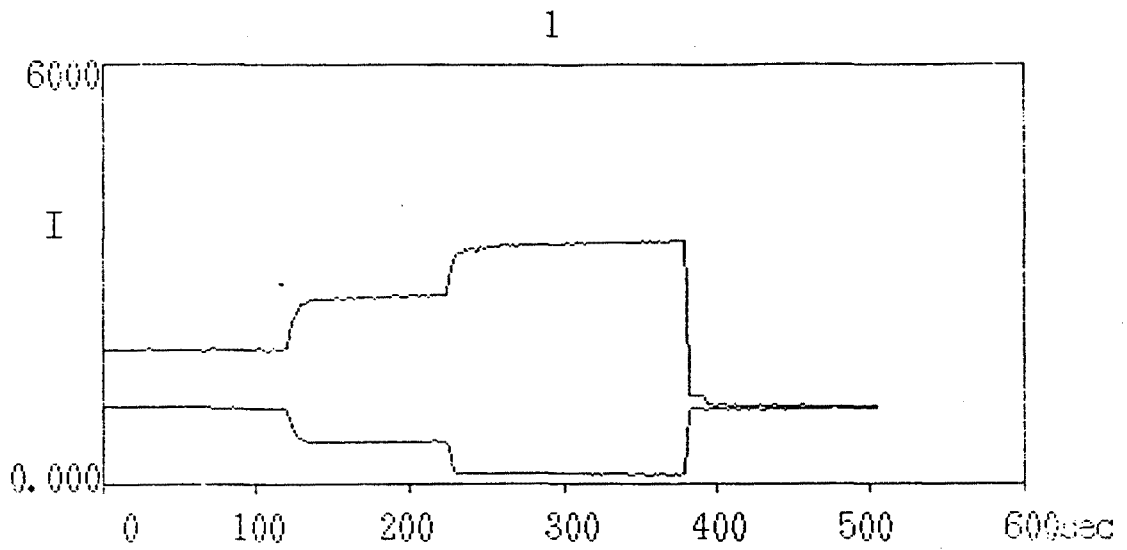


Figura 2. Calci intraplaquetar post-trombina

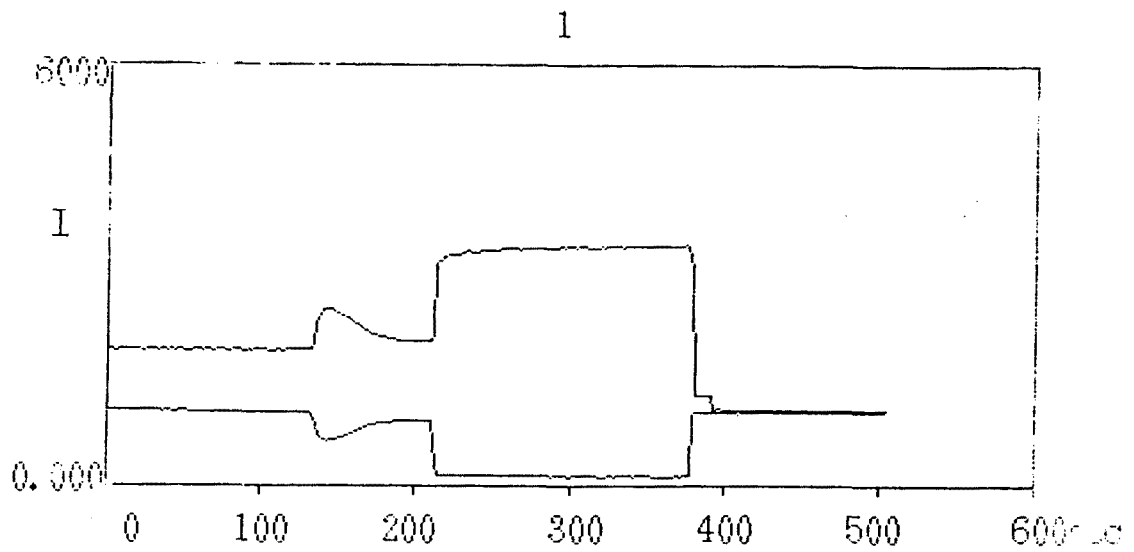


Figura 3. Calci plaquetar post-vasopressina

## 5.- ESTUDI ESTADÍSTIC

### 5.1.- VARIABLES

#### Variabes quantitatives:

- CALCI INTRAPLAQUETARI:

Valor dels nivells basals de  $Ca^{2+}$ , en nmol/L assolits en cada un dels períodes de gestació: CAB1, CAB2, CAB3 i CABP pel primer, segon, tercer trimestre i postpart respectivament. Quan s'utilitzi estimulació amb trombina, designarem les variables com CAT1, CAT2, CAT3 i CATP. Quan l'estimulació sigui amb vasopressina, les anomenarem CAV1,CAV2, CAV3, CAVP.

- PARÀMETRES HEMATOLÒGICS I BIOQUÍMICS:

S'estudien els paràmetres plaquetaris de: recompte plaquetari (PL), volum plaquetari (VP), distribució plaquetària (PD), calci sèric (CA), àcid úric (UR), proteïnes totals (PR) i albúmina sèrica (AB). Cada un dels paràmetres serà determinat a cada trimestre i en el postpart i expressat en les unitats habituals obtingudes pels tests de laboratori rutinaris en el nostre hospital. Es determinarà en cada cas quines són aquestes unitats.

Variables qualitatives:

■ PGE:

Valor PGE<sub>1</sub> mínima inhibidora en nanograms (o en ng/mL), que serà designada com PG1, PG2, PG3 i PGP pel primer, segon, tercer trimestres i postpart respectivament.

■ TIPUS DE GESTACIÓ:

Que es divideix segons les següents categories:

- NG: no-gestant
- CC: gestant normal
- A1: gestant hipertensa no-proteïnúrica
- A3: gestant hipertensa proteïnúrica
- B1: gestant hipertensa crònica
- B3: gestant hipertensa crònica amb preeclàmpsia sobreafegida

## **5.2.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC**

La recollida de dades generals es farà per interrogatori al pacient i serà realitzat sempre per la mateixa persona. Les variables quantitatives s'obtidran a través dels dos tests de laboratori descrits.

Totes les dades seran recollides de manera codificada en un full fet a tal efecte i introduïdes en el programa de base de dades DBASE III+.

Per la resolució de les hipòtesis enunciades en el punt "Hipòtesis de treball", aplicarem les proves estadístiques adients segons el tipus i distribució de les variables i la mida de la mostra. Utilitzarem el paquet estadístic SSPS-PC+ (Statistical Package for Social Sciences) pel processament de les dades, aplicant el subprograma T-TEST GROUPS o ONE-TAIL ANOVA per la comparació de mitjanes amb dades independents i T-TEST PAIRS o MANOVA per la comparació de mitjanes amb dades aparellades. S'utilitzarà el test de  $\chi^2$  per la comparació de variables qualitatives.

Els **interval·ls de referència o de normalitat** a l'estudi longitudinal s'expressaran en **mitjana i dues desviacions estàndard (X i 2SD)**. Les **comparacions de les mitjanes** entre diferents grups seran expressades en **mitjana i interval de confiança (X i IC)**. Les diferències es consideraran estadísticament significatives quan obtinguem una  $p < 0.05$  en considerar tots els grups en global, i una  $p < 0.01$  quan analitzem subgrups per separat segons la correcció de Bonferroni.

En el test de sensibilitat a la  $PGE_1$  es determinaran la sensibilitat, l'especificitat i els valor predictius positiu i negatiu ajustats, segons la següents fórmules:

Sensibilitat =  $\text{Veritables (+)} \times 100 / \text{Veritables (+)} + \text{Falsos (-)}$

Especificitat=  $\text{Veritables (-)} \times 100 / \text{Veritables (-)} + \text{Falsos (+)}$

Valor Predictiu Positiu =  $\text{Veritables (+)} \times 100 / \text{Veritables (+)} + \text{Falsos (+)}$

Valor Predictiu Negatiu =  $\text{Veritables (-)} \times 100 / \text{Veritables (-)} + \text{Falsos (-)}$

Per calcular el valor predictiu positiu i negatiu ajustats en el test de sensibilitat a la PGE<sub>1</sub>, utilitzarem un *cut-off* de 40 ng/mL (ó 10 ng en dosi absoluta).

