



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorat en Medicina
Departament de Medicina

TESI DOCTORAL

EFFECTES DE LA TIROTROPINA SOBRE L'HEMOSTÀSIA: Avaluació a l'hipotiroïdisme i després de l'administració de TSH humana recombinant.

Autora: Eulàlia Colomé Tatché

Director de Tesi Doctoral: Dr. Jordi Lluís Reverter Calatayud

Tutor acadèmic de Tesi Doctoral: Dr. Manel Puig Domingo

Setembre 2019

Als meus pares, a l'Amalia i al Pere, a la meva germana, al Tomàs i a la Sophia.

AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair a totes les persones que han format part d'aquest treball de d'investigació des de l'inici:

Al Dr. Jordi Reverter, director d'aquesta tesi doctoral, per tot el que m'ha ensenyat i m'ha aguantat, sempre hem gaudit i rigut fent feina junts, per molts anys més que puguem seguir-ho fent.

Al Dr. Joan Carles Reverter, que m'ha guiat de manera espectacular per l'interessant però complicat món de la coagulació.

Al Dr. Manel Puig Domingo, tutor d'aquesta tesi doctoral, em va donar l'última empenta per tirar endavant el final d'aquest projecte.

Als tots els companys del Dr. Joan Carles Reverter a l'Hospital Clínic que m'heu ajudat en el procés.

A la Dra. Anna Sanmartí, la Jefa, per ser com és, per tot el que em va ensenyar i transmetre. Sempre seràs el meu referent.

A la Dra. Tere Julian, per ajudar-me inicialment a recollir mostres i, finalment, a indicar-me com es presenta una tesi doctoral.

A la Dra. Marisa Granada per resoldre'm sempre la part de la Bioquímica.

A tots els d'endocrino de Can Ruti. Em vau formar, em vau acompanyar, sou part de la meva família i de la persona que soc.

A l'Anna Gutiérrez i a la Dra. Carme Vilardell per haver-me donat sempre totes les facilitats per poder dedicar-me a la tesi. Sou les millor companyes que un pot desitjar! I a tots els de l'hospital de Manresa, ja jubilats o en actiu, la meva nova família que no para de créixer.

A la Dra. Anna Arnau per les ajudes urgents en l'estadística.

A la Rosa Maria Colomé, la meva tieta, per corregir-me la gramàtica i l'ortografia de tot el document.

A la Montse Pous i a la Laura per cuidar tan bé del Pere mentre jo treballava amb la tesi.

I a tota la meva família per tot el que m'heu aguantat. Sou el més important que tinc sense cap dubte.

ABREVIATURES

ASAT	Aspartat aminotransferasa
aTg	Anticossos antitiroglobulina
aTPO	Anticossos antiperoxidasa
ATPP	Temps de tromboplastina parcial activat
CDT	Carcinoma diferenciat tiroidal
F1+2	Fragment 1+2 de la protrombina
fVW	Factor von Willebrand
LDH	Lactat deshidrogenasa
MP	Micropartícules
NETS	Neutrophil Extracellular Traps
PAF	Factor activador de les plaquetes
PAI-1	Inhibidor de l'activador del plasminogen de tipus 1
PAI-2	Inhibidor de l'activador del plasminogen de tipus 2
PCR	Proteïna C reactiva
rhTSH	TSH humana recombinant
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina

ABREVIATURES

TAFI	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TAT	Complex trombina-antitrombina
TF	Factor Tissular
TFPI	Inhibidor de la via del factor tissular
tPA	Activador tissular del plasminogen
TRH	Hormona alliberadora de tirotropina
TSH	Tirotropina

ÍNDEX

1. ABSTRACT	23
2. INTRODUCCIÓ	29
2.1. HIPOTIROÏDISME	32
2.2. CARCINOMA DIFERENCIAT TIROÏDAL33	
2.2.1 Definició	33
2.2.2. Tractament i seguiment	34
2.3. L'HEMOSTÀSIA.....	35
2.3.1. Endoteli	36
2.3.2. Plaquetes.....	37
2.3.3. Coagulació plasmàtica	38
a) Fase d'iniciació de la coagulació plasmàtica	39
b) Fase d'amplificació de la coagulació plasmàtica	40
2.3.4. Mecanismes reguladors.....	41
2.3.5. Sistema fibrinolític	42
a) Plasminogen i plasmina.....	42
b) Activadors del plasminogen.....	42
c) Inhibidors de l'activació del plasminogen	43
d) Inhibidors de la plasmina	43
2.4. ALTRES ELEMENTS REGULADORS DE L'HEMOSTÀSIA	44
2.4.1. Micropartícules circulants.....	44

a) Determinació de MP	47
b) MP en situacions patològiques	51
2.5 HIPOTIROÏDISME, MALALTIA CARDIOVASCULAR I COAGULACIÓ	55
2.5.1. Hipotiroïdisme subclínic, malaltia cardiovascular i trombosi.....	56
2.5.2. Hipotiroïdisme clínic, malaltia cardiovascular i trombosi.....	56
2.5.3. Hipotiroïdisme subclínic i coagulació.....	57
2.5.4. Hipotiroïdisme clínic i coagulació	59
2.6. TSH HUMANA RECOMBINANT (rhTSH) I COGULACIÓ	62
3- HIPÒTESI	65
4- OBJECTIUS	69
4.1. OBJECTIU PRINCIPAL.....	71
4.2. OBJECTIUS SECUNDARIS	71
5- PACIENTS I MÈTODES	73
5.1. ESTUDI 1: EFECTES DE L' ELEVACIÓ DE LA TSH PER HIPOTIROÏDISME SUBCLÍNIC I CLÍNIC SOBRE PARÀMETRES DE LA COGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS	75
5.1.1. Població de l'estudi	75
a) Grup de pacients amb hipotiroïdisme subclínic	75
b) Grup de pacients amb hipotiroïdisme clínic	76
c) Grup control	77
5.1.2. Mètodes	78
a) Dades clíniques	78

b) Avaluació dels paràmetres bioquímics, hormonals i de l'hemostàsia	79
c) Consentiment informat	86
d) Anàlisi estadística.....	87
5.2. ESTUDI 2: EFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ EXÒGENA DE TSH HUMANA RECOMBINANT SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS EN PACIENTS AMB CARCINOMA DIFERENCIAT DE TIROIDE.....	88
5.2.1. Població de l'estudi	88
5.2.2. Mètodes	89
a) Dades clíniques	89
b) Administració de rhTSH	90
c) Avaluació dels paràmetres bioquímics, hormonals i de l'hemostàsia	90
c) Consentiment informat	96
d) Anàlisi estadística.....	96
7- RESULTATS.....	99
7.1. RESULTATS ESTUDI 1: EFECTES DE L'ELEVACIÓ DE LA TSH PER HIPOTIROÏDISME SUBCLÍNIC I CLÍNIC SOBRE PARÀMETRES DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS.....	101
7.1.1. Dades clíniques	101
7.1.2. Paràmetres bioquímics	102
7.1.3. Paràmetres hormonals	104
7.1.4. Paràmetres de l' hemostàsia	105

7.1.5. Avaluació dels paràmetres de l'hemostàsia després del tractament amb levotiroxina	108
a) Pacients amb hipotiroidisme subclínic.....	108
b) Pacients amb hipotiroidisme clínic.....	111
7.1.6. Avaluació global de l'hemostàsia als pacients amb hipotiroidisme	113
7.1.7. Correlacions entre variables de l'hemostàsia i TSH i T4 lliure	116
7.2. RESULTATS ESTUDI 2: EFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ EXÒGENA DE TSH HUMANA RECOMBINANT SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS EN PACIENTS AMB CARCINOMA DIFERENCIAT DE TIROIDE	117
7.2.1. Dades clíniques	118
7.2.2. Paràmetres hormonals, bioquímics i de l'hemostàsia abans de l'administració de rhTSH	118
7.2.3. Paràmetres hormonals, bioquímics i de l'hemostàsia després de l'administració de rhTSH	120
8- DISCUSSIÓ.....	125
8.1. HIPOTIROÏDISME I ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ	127
8.2. EFECTES DEL TRACTAMENT DE L'HIPOTIROÏDISME AMB LEVOTIROXINA	136
8.3. rhTSH I ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ	138
8.4. EFECTE DIRECTE DE LA TSH SOBRE LA COAGULACIÓ I L'ENDOTELI	142
9- CONCLUSIONS	145

10- LÍNIES DE FUTUR.....	149
11- BIBLIOGRAFIA	159
12- ÍNDIX DE TAULES	189
13- ÍNDIX DE FIGURES.....	193

1. ABSTRACT

Hypothyroidism has been shown to activate coagulation, either by decreasing peripheral hormones T3 and T4 in the case of overt hypothyroidism or by increasing TSH without changes in peripheral hormones in subclinical hypothyroidism. rhTSH is a synthetic hormone administered in patients with thyroid cancer that should be subjected to treatment or exploration with radioiodine. There are few studies that evaluate the relationship between the administration of rhTSH and its effects on coagulation, and only one of them demonstrates a proatherogenic activation of the vascular endothelium and platelets, others do not find alterations of coagulation in these patients. In relation to coagulation, microparticles (MP) are emerging as very useful biomarkers. These MP are anucleated plasma cellular vesicles of 0.1 to 1 μm in diameter from a wide variety of cells with procoagulant capacity and have the ability to modify the vascular function by inducing biological responses that participate in vascular homeostasis.

The purpose of this PhD project is to evaluate coagulation parameters and quantification of procoagulant MP in patients with overt and subclinical hypothyroidism and in patients undergoing rhTSH treatment and therefore with transient elevation of TSH while maintaining normal values of free T4 and free T3.

We measured the thrombin-antithrombin complex, prothrombin fragment 1+2, activated factor VII, D dimer and procoagulant MP in the group of patients with overt and subclinical hypothyroidism at the time of diagnosis and after 6 months of treatment with levothyroxine and with a normalized thyroid function when measured. In the patient group subjected to rhTSH, the level of procoagulant MP and activated factor VII was studied before treatment and on days 3, 5 and 10 post treatment. We have shown that patients with overt as well as subclinical hypothyroidism exhibit higher levels of

ABSTRACT

prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin complexes, activated factor VII and procoagulant MP at the time of diagnosis that after 6 months, when they already have a normal thyroid function. Moreover, in the study of patients undergoing rhTSH we have reported elevated procoagulant MP and activated factor VII after synthetic hormone administration, reaching a maximum peak 5 days after administration and returning to baseline levels in day 10.

In conclusion, all situations evaluated where there is high TSH levels have shown an activation of the coagulation, either through the increase of more classical parameters of coagulation, or through the increase of procoagulant MP. Since procoagulant MP are also increased in high-risk cardiovascular situations, as well as activated factor VII which has been measured to be elevated in cardiovascular diseases, it can be suspected that these patients, apart from being in a procoagulant situation, may present a higher cardiovascular risk when in situations of TSH elevation.

L'hipotiroïdisme s'ha demostrat que activa la coagulació, ja sigui a través de la disminució de les hormones perifèriques T3 i T4 en el cas de l'hipotiroïdisme clínic o a través de l'elevació de la TSH en l'hipotiroïdisme subclínic. La rhTSH és una hormona sintètica que s'administra en pacients amb càncer de tiroide i que han de ser sotmesos a un tractament o exploració amb radioiodo. Hi ha pocs estudis que valorin la relació entre l'administració de rhTSH i els seus efectes sobre la coagulació, i només un d'ells posa en evidència una activació proaterogènica de l'endoteli vascular i de les plaquetes, els altres no troben alteracions de la coagulació en aquests pacients. En relació a la coagulació, darrerament s'estan estudiant uns biomarcadors molt prometedors: les micropartícules (MP). Aquestes MP són vesícules cel·lulars plasmàtiques anucleades de 0.1 a 1 µm de diàmetre procedents d'una àmplia varietat de cèl·lules amb capacitat procoagulant i habilitat per modificar la funció vascular induint respostes biològiques que participen en l'homeòstasi vascular.

L'objectiu d'aquest projecte de tesi doctoral ha estat avaluar paràmetres de la coagulació i quantificació de MP procoagulants en pacients amb hipotiroïdisme clínic i subclínic i en pacients sotmesos a tractament amb rhTSH i, per tant, amb elevació transitòria de la TSH mantenint valors normals de T4 lliure i T3 lliure.

En el grup de pacients amb hipotiroïdisme clínic i subclínic s'ha mesurat el complex trombina-antitrombina, el fragment 1+2 de l'antitrombina, factor VII activat, el dímer D i les MP procoagulants, entre d'altres, en el moment del diagnòstic i després de 6 mesos de tractament amb levotiroxina i amb funció tiroïdal ja normalitzada. En el grup de pacients sotmesos a rhTSH, se'ls ha estudiat el valor de MP procoagulants i de factor VII activat, entre d'altres, abans del tractament i els dies 3, 5 i 10 posttractament. Hem

ABSTRACT

objectivat que els pacients amb hipotiroïdisme, tant clínic com subclínic, presenten nivells més elevats de fragment 1+2 de la protrombina, de complexos trombina-antitrombina, de factor VII activat i de MP procoagulants en el moment del diagnòstic que al cap de 6 mesos, quan ja presenten una funció tiroïdal normal. I a l'estudi dels pacients sotmesos a rhTSH hem objectivat una elevació de MP procoagulants i de factor VII activat després de l'administració de l'hormona sintètica, assolint un pic màxim als 5 dies postadministració i tornant a nivells basals al dia 10.

En conclusió, totes les situacions avaluades on hi ha elevació de la TSH mostren una activació de la coagulació, ja sigui a través de l'elevació de paràmetres de la coagulació més clàssics, com de l'elevació de MP procoagulants. Ja que les MP procoagulants també s'han vist augmentades en situacions d'alt risc cardiovascular, igual que el factor VII activat, que també s'ha objectivat elevat en situacions de malaltia cardiovascular, es pot sospitar que, aquests malalts, a part d'estar en una situació procoagulant, poden presentar un risc de malaltia cardiovascular més elevat quan estan en situacions d'elevació de la TSH.

1. INTRODUCCIÓ

Les hormones tiroïdals regulen el metabolisme corporal i el funcionament de diferents òrgans. L'hipotiroïdisme és una de les malalties tiroïdals més freqüent a la nostra societat (1), on apareix un dèficit progressiu d'hormona tiroïdal, inicialment subclínic i posteriorment clínic. Els efectes de l'hipotiroïdisme sobre l'organisme humà són múltiples i molts d'ells encara desconeguts, ja que la tirotròpina (TSH), hormona que es troba elevada en els pacients amb hipotiroïdisme, i les hormones tiroïdals perifèriques, hormones que poden estar disminuïdes, tenen receptors a moltes cèl·lules del cos (1).

L'hemostàsia és un procés vital essencial que pretén mantenir la integritat del torrent sanguini en el cos humà aturant, amb el mecanisme de la coagulació, el sagnat, però sense provocar que es produeixin coàguls que obstrueixin la circulació (2). Uns dels efectes ocasionats pel desequilibri coagulació-anticoagulació són els processos de trombosi, que comporten una de les principals causes de mortalitat al nostre entorn (cardiopatia isquèmica, ictus i tromboembolisme venós) (3). Aquest desequilibri pot ser la raó per la qual paràmetres que indiquen el grau d'activació de la coagulació poden servir com a biomarcadors de risc cardiovascular (4).

El coneixement de la fisiologia de l'hemostàsia s'ha anat complicant progressivament i, actualment, als actors clàssics que regulen aquest sistema (factors de la coagulació i la fibrinòlisi, anticoagulants naturals i plaquetes) se n'hi han afegit d'altres, entre els quals destaquen les micropartícules (MP) i els NETS (Neutrophil Extracellular Traps), que poden ser, especialment les primeres, uns actors fonamentals en la fisiologia de l'hemostàsia (5).

INTRODUCCIÓ

La influència de la disfunció tiroïdal sobre l'hemostàsia és una relació complexa i encara ara per ara no coneixem exactament ni els mecanismes subjacents, ni el seu impacte clínic (6), ni el paper diferenciat de la TSH o de les hormones tiroïdals com a origen de l'alteració de la coagulació. En aquest sentit, una situació clínic especial que des del punt de vista de l'efecte de la TSH es gairebé un model experimental es la del pacient tiroïdectomitzat per carcinoma diferenciat de tiroide, que es pot aprofitar per fer estudis en l'hemostàsia. Aquest pacient està en un estat d'hipertiroïdisme subclínic sota tractament amb levotiroxina sòdica, i quan s'exposa a tractament amb TSH humana recombinant (rhTSH, Thyrogen[®], Genzyme Transgènics Corporation, Cambridge, MA) als pocs dies passa d'una TSH pròxima al 0 a una TSH >30mUi/mL (7).

Per aclarir els punts en què es basen els estudis sobre l'efecte de la TSH en l'hemostàsia, en els següents apartats de la revisió es farà una exposició del que és l'hemostàsia, amb especial referència a les MP i també a la patologia tiroïdal (hipotiroïdisme i elevació de la TSH per administració de rhTSH) i de la relació entre la TSH i alteracions de l'hemostàsia.

2.1. HIPOTIROÏDISME

L'hipotiroïdisme és el quadre resultant de la carència dels efectes de l'hormona tiroïdal sobre els teixits de l'organisme (8). Aquest pot ser subclínic o clínic. La definició de cada un dels estats és només aplicable quan la funció tiroïdal ha estat estable durant setmanes, l'eix hipotàlam-hipòfisi-tiroide és normal, i no hi ha malaltia greu actual o recent (1). L'hipotiroïdisme subclínic es caracteritza per unes concentracions de TSH

superiors al límit de referència, amb unes concentracions de T4 lliure normals. L'hipotiroïdisme clínic es defineix per una TSH elevada amb una concentració de T4ll per sota del límit de la normalitat (1).

Existeix consens general sobre tractar els pacients amb hipotiroïdisme primari que presentin TSH >10 mUI/L. L'American Thyroid Association també recomana considerar el tractament en pacients amb TSH <10 mUI/L i que presentin símptomes d'hipotiroïdisme, anticossos antitiroïdals positius, en el cas de dones embarassades, o en pacients amb malaltia o risc cardiovascular (1). Pel tractament de l'hipotiroïdisme s'utilitzen preparacions sintètiques de levotiroxina sòdica (1).

2.2. CARCINOMA DIFERENCIAT TIROIDAL

2.2.1 Definició.

El carcinoma diferenciat tiroïdal (CDT) és el que s'origina a partir de les cèl·lules fol·liculars de la glàndula. És el responsable de la majoria de càncers de la tiroide i és la neoplàsia endocrinològica més freqüent. Per ordre de freqüència, l'estirp més freqüent del CDT és la papil·lar, que suposa un 75-85% dels casos (9), seguida del carcinoma fol·licular amb un 10-15% dels casos.

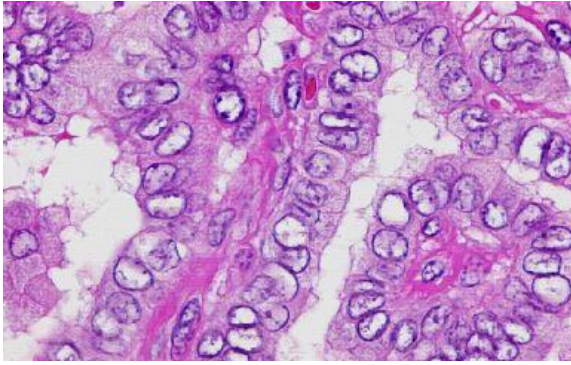


Figura 1. Histologia del carcinoma papil·lar de tiroide.

2.2.2. Tractament i seguiment

La gran majoria de pacients amb CDT se sotmeten a una tiroidectomia total, seguit de tractament ablatiu amb radioiode (^{131}I) si està indicat (10). El iode radioactiu també s'administra a posteriori per realitzar rastrejos corporals totals que poden detectar lesions no visualitzades en el moment del diagnòstic o recidives de la malaltia.

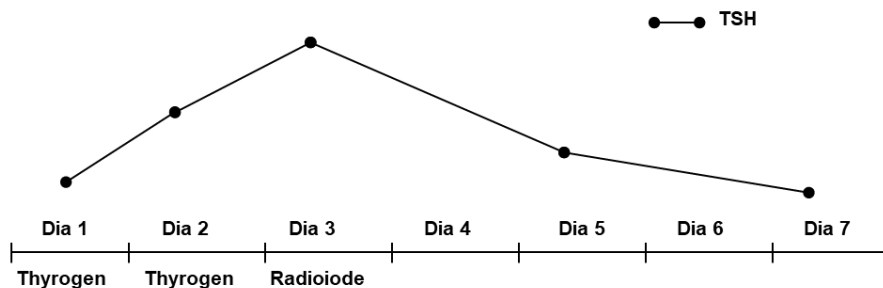
La tiroglobulina (Tg), proteïna produïda per cèl·lules de la tiroide (ja siguin cèl·lules sanes com cèl·lules tumorals), s'utilitza com a un marcador tumoral específic i extremadament útil per al seguiment de pacients amb carcinoma diferenciat de tiroide, sempre en aquells pacients a qui s'ha realitzat prèviament una tiroidectomia total. Un dels criteris utilitzats per considerar que els pacients estan lliure de malaltia és presentar concentracions mínimes o indetectables d'aquesta proteïna després d'haver rebut el tractament esmentat (11).

Per a realitzar una determinació efectiva de Tg en el seguiment dels pacients amb CDT es requereix d'una estimulació de Tg adequada amb TSH, considerant-se que aquesta

ha d'arribar a un valor $>30\text{mUI/L}$ en el moment de la determinació de la Tg (12). Per aconseguir aquesta situació es pot administrar rhTSH mentre el pacient continua el tractament amb levotiroxina sòdica, amb augment de la TSH, però mantenint valors de T3 i T4 normals i, per tant, preservant la qualitat de la vida (7).

La rhTSH s'injecta intramuscularment durant dos dies consecutius, i el tercer dia s'administra la dosi de iode radioactiu (10). Després de l'administració de rhTSH, el pacient presenta concentracions de TSH elevades, però mantenint la concentració de T4 normal i sense variacions al llarg dels dies d'estudi. Així, les concentracions màximes de TSH obtingudes després l'administració de rhTSH s'observen en el 3r dia després de la primera injecció, i retornen als valors basals en el dia 7 (13). (Figura 2).

Figura 2. Esquema d'administració de rhTSH (Thyrogen®), de radioiode i canvis en els valors de la TSH al llarg dels dies.



Modificat de Luster. *Endocrine-related cancer*. 2005 (10)

2.3. L'HEMOSTÀSIA

L'hemostàsia és un sistema biològic regulador del procés de formació de coàguls de sang que actua en el lloc on s'ha presentat la lesió d'un vas. Quan s'interromp la paret d'un

INTRODUCCIÓ

vas sanguini la resposta hemostàtica ha de ser ràpida, localitzada i regulada acuradament per produir un taponament sanguini i aturar el sagnat de la zona lesionada.

El sagnat excessiu i el seu contrari, la trombosi (és a dir, la coagulació de la sang no fisiològica i no requerida per a la regulació hemostàtica que porta a l'oclusió de vasos sanguinis) poden ocórrer quan es perd l'adequada regulació dels elements biològics específics implicats en els processos de l'hemostàsia o aquests són disfuncionals (14).

El procés fisiològic per aturar el sagnat tradicionalment s'ha considerat dividit en quatre etapes: a) vasoconstricció de la zona lesionada; b) formació d'un agregat de plaquetes sobre la lesió; c) formació i estabilització de la fibrina, a través de la generació de trombina, i, finalment, d) eliminació de la fibrina per la fibrinòlisi. Seguidament revisarem els diferents components implicats i les seves funcions en el procés de l'hemostàsia fisiològica.

2.3.1. Endoteli

En condicions normals l'endoteli disposa d'una superfície antitrombòtica que inhibeix l'adhesió i agregació plaquetària, alhora que produeix inhibidors de la coagulació i de l'agregació de les plaquetes. La lesió de l'endoteli provoca l'exposició dels elements subendotelials a la sang que circula (principalment el col·lagen, el factor von Willebrand, la fibronectina i la vitronectina), promovent el reclutament de les plaquetes i, com a conseqüència, de cèl·lules de diferents tipus, de MP i d'altres factors procoagulants (15).

2.3.2. Plaquetes

Les plaquetes són fragments cel·lulars anucleats procedents de la fragmentació del citoplasma dels megacariòcits de la medul·la òssia (14). Les plaquetes s'activen en el lloc de la lesió vascular per formar un tap de plaquetes que proporciona la resposta hemostàtica inicial per aturar el sagnat i, a més, contribueixen en els processos de la coagulació plasmàtica, sobretot per exposició de fosfolípids aniònics a la seva membrana, per alliberament local de factors procoagulants i per reclutament de MP procoagulants (14).

Inicialment, es produeix l'activació plaquetària, que està estimulada pel col·lagen, que queda exposat en el moment de produir-se una lesió de la paret del vas, i la trombina principalment, i d'altres com l'adenosina difosfat (ADT) i l'epinefrina (14,15). Després de l'activació, les plaquetes canvien la seva forma i produeixen pseudòpodes allargats, fent-les extremadament adhesives, iniciant-se l'adhesió plaquetària. Aquesta adhesió és causada, bàsicament, per la interacció de les glicoproteïnes receptores de les seves membranes (principalment el complex glicoproteic GP-Ib-IX) amb les proteïnes associades a les superfícies vasculares, especialment subendotelials, com el fibrinogen, el col·lagen, la fibronectina, la vitronectina i el fVW. Conjuntament a l'adhesió, es produeix l'alliberament de els grànuls de les plaquetes (16).

Una vegada adherides les plaquetes es produeix un canvi de conformació de la glicoproteïna de membrana plaquetària GP IIb/IIIa amb alta afinitat pel receptor del fibrinogen, fet que facilitarà l'agregació plaquetària, entre elles i amb més plaquetes lliures (17). Seguidament, per externalització, incrementen el seu contingut de

INTRODUCCIÓ

fosfolípids de càrrega negativa, especialment de fosfatidilserina, cosa que facilita la unió dels factors de la coagulació que porten a la generació de la trombina (18). Alhora, aquest canvi de conformació també afavorirà la interacció de les plaquetes amb el fVW, fet que farà que les plaquetes s'estenguin cap al subendoteli (19).

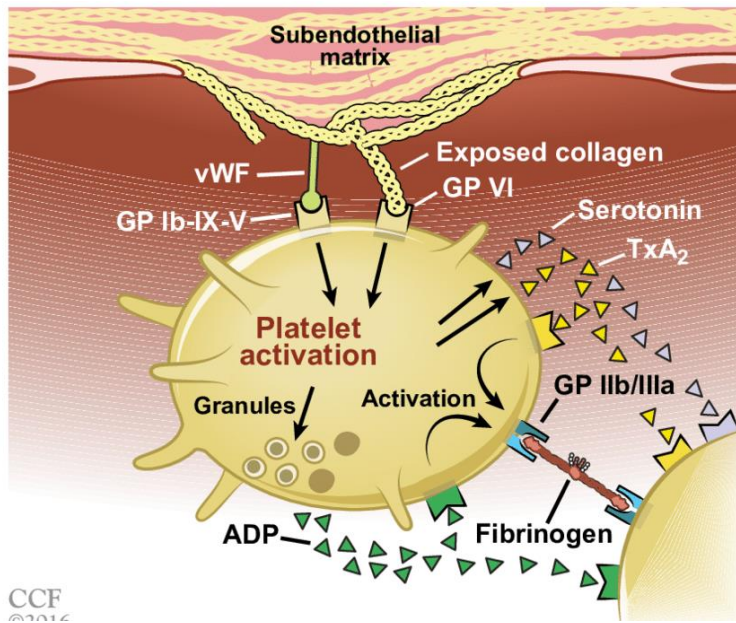


Figura 3. Agregació plaquetària.

Extret de Halker. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2016. (20)

ADP = adenosina difosfat; **GP** = glicoproteïna; **TxA₂** = tromboxà A₂; **vWF** = fVW.

2.3.3. Coagulació plasmàtica

La coagulació és el conjunt de reaccions que condueixen a la formació de fibrina, que és una proteïna insoluble que forma la base dels coàguls que eviten la pèrdua de sang quan es lesiona un vas (14). La característica central de la cascada de coagulació és l'activació

seqüencial d'una sèrie de proenzims o proteïnes precursors inactius a enzims actius, que acaben produint una amplificació significativa de la resposta(15).

El model actual de la coagulació plasmàtica és un model mixt plasmàtic i cel·lular que inclou les proteïnes del plasma i les plaquetes, a les que cal afegir-hi altres components d'origen cel·lular com són els monòcits i les MP circulants (15).

a) Fase d'iniciació de la coagulació plasmàtica.

Actualment s'ha establert que el principal esdeveniment fisiològic en l'inici de la coagulació és la generació o l'exposició del factor tissular (TF) al torrent sanguini. Els monòcits prèviament activats poden expressar el TF a les seves membranes dins de la circulació, en canvi les cèl·lules endotelials no l'expressen a la cara luminal del vas i només queda exposat en el moment de la lesió endotelial. El TF també pot estar circulant pel torrent sanguini dins de MP derivades d'altres cèl·lules, amb capacitat de fusionar-se amb les plaquetes activades i iniciar també la coagulació (21–23).

El TF exposat pateix un canvi de conformació, promogut per enzims alliberats per les plaquetes, i aleshores serveix de cofactor per activar el factor VII a factor VII activat. El complex TF -factor VII activat activa al factor X a factor X activat i aquest inicia la generació de trombina pel complex protrombinasa (factor X activat, factor V activat i fosfolípids aniónics) que converteix la protrombina a trombina (24). La petita quantitat de trombina generada activa al factor V, al factor VIII (que està unit al fVW plasmàtic) i a les plaquetes, que aportaran la superfície fosfolipídica perquè es puguin muntar els complexos enzimàtics de multi-component. Tot això és el que es diu fase d'iniciació de la coagulació plasmàtica (25).

INTRODUCCIÓ

La trombina formada activa també al factor IX iniciant-se així la fase d'amplificació de la coagulació. La trombina generada, a més, activa el factor XI en forma de retroalimentació, cosa que fa que s'amplifiqui encara més la generació de trombina.

b) Fase d'amplificació de la coagulació plasmàtica.

El factor IX activat és generat per la trombina a la fase d'amplificació, o apareix com a resultat de la activació del factor XI o per la trombina o per el factor XII activat, que prové de l'activació del factor XII per les superfícies carregades negativament com les fibres de col·lagen (26), generant-se grans quantitats de trombina en la que es diu fase d'amplificació de la coagulació plasmàtica (25). El factor IX unit al factor VIII sobre una superfície fosfolípídica aniònica i en presència de Calci, forma el complex tenasa (18), que activa el factor X a factor X activat a partir del qual es forma el complex protrombinasa (factor X activat, factor V activat i fosfolípids aniònics) (27,28) que provoca la formació de trombina a partir de la protrombina (29,30). Durant aquest procés d'activació de la protrombina a trombina, s'allibera un fragment de la protrombina conegut com fragment 1+2 de la protrombina (F1+2). L'F1+2 es pot fer servir com a un indicador de la quantitat de trombina generada, ja que són directament proporcionals. La trombina converteix el fibrinogen en fibrina soluble formant-se la xarxa de fibrina sobre la que s'adhereixen hematies, leucòcits i plaquetes, formant el coàgul (31). Aquesta és la fase de propagació. Finalment, la trombina activa el factor XIII a factor XIII activat, el qual converteix la fibrina soluble en insoluble substituint els enllaços iònics a enllaços covalents (32), en un procés anomenat fase d'estabilització.

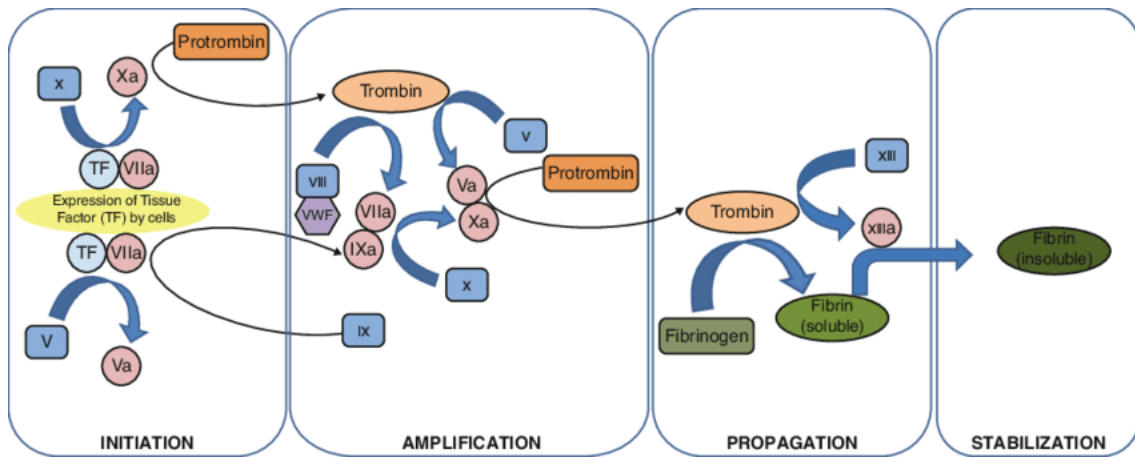


Figura 4. Representació clàssica de la cascada de coagulació incloses les seves quatre vies (iniciació, amplificació, propagació i estabilització).

Extret de Bittar. *Biomarkers in Cardiovascular Disease*. 2015 (33)

TF = factor tissular. VWF = fVW.

2.3.4. Mecanismes reguladors

La cascada de coagulació explicada dona lloc a una resposta hemostàtica ràpida i localitzada, però si no es controla pot produir trombosi i dany tissular. Els mecanismes reguladors de la coagulació impedeixen que es produeixin aquestes situacions, són mecanismes anticoagulants naturals i el sistema de la fibrinòlisi (14,15).

Els principals factors reguladors són l'antitrombina, la proteïna C i S i l'inhibidor de la via del factor tissular (TFPI). L'antitrombina és el principal inhibidor de la trombina i del factor X activat, però també dels factors IX activat, XI activat i XII activat (14). Quan l'antitrombina s'uneix a la trombina es forma el complex trombina-antitrombina (TAT), que es pot fer servir com a marcador de la quantitat de trombina produïda, en

INTRODUCCIÓ

conseqüència, de l'activació de la coagulació. La proteïna C inhibeix la formació de trombina i s'activa per acció de la trombina unida a trombomodulina. La forma activa de la proteïna C conjuntament amb la proteïna S com a cofactor, inactiven per degradació proteolítica els factors V activat i VIII activat, aturant d'aquesta forma la cascada de la coagulació i la formació de trombina (14,15). I, finalment, el el TFPI, present en molta menys quantitat que l'antitrombina, i que inhibeix com a pas final el factor VII activat que està unit al TF impedint la formació de trombina (34–36).

2.3.5. Sistema fibrinolític

El sistema fibrinolític té com objectiu la lisi de la fibrina i és un sistema reactiu a l'activació de la coagulació i a la generació final de trombina (14). Els principals components de la fibrinòlisi són:

a) Plasminogen i plasmina

El plasminogen s'uneix a la fibrina i a l'activador tissular del plasminogen (tPA) convertint-se en plasmina, enzim principal i central d'aquest sistema fibrinolític(14), la qual provoca la degradació proteolítica de la fibrina (37,38). En aquesta degradació es produeix el dímer D.

b) Activadors del plasminogen

Els dos principals activadors del plasminogen són el tPA i l'activador del plasminogen de tipus, secretats per les cèl·lules endotelials vasculares. El tPA s'uneix al plasminogen i a la fibrina fent que el plasminogen es converteixi en plasmina. L'activador del plasminogen

de tipus urokinasa s'activa per la plasmina, provocant l'activació del plasminogen. La urokinasa no s'uneix a la fibrina, sinó que la seva acció es produeix principalment a la superfície cel·lular unint-se al seu receptor (37,38).

c) Inhibidors de l'activació del plasminogen

Els principals inhibidors de l'activació del plasminogen són el PAI-1 i PAI-2 (plasminogen activator inhibidors type 1 i type 2) (37,38). El PAI-1 és alliberat fonamentalment per les cèl·lules de l'endoteli i per les plaquetes quan existeix activació cel·lular. El PAI-2 és molt similar al PAI-1, però d'origen a la placenta, i es troba a títols elevats a la gestació (39). El PAI-1 i 2 actuen inhibint el tPA i el TAFI (thrombin-activatable fibrinolisi inhibidor). El TAFI és activat per la trombina/trombomodulina i la plasmina. Així, la trombina que s'ha generat durant l'activació de la coagulació no només és responsable de la formació de fibrina, sinó que, a través de la trombina/trombomodulina o del complex TAT, també és capaç de protegir-la de la lisi mitjançant l'activació del TAFI (14). El TAFI, doncs, inhibeix la fibrinòlisi i provoca un retard en la lisi del coàgul (15).

d) Inhibidors de la plasmina

L'alfa 2 antiplasmina és el principal inhibidor fisiològic de la plasmina (40), formant un complex irreversible plasmina/antiplasmina. Es pot enllaçar al coàgul de fibrina mitjançant el factor XIII activat i confereix al trombus resistència davant de la plasmina. De totes maneres, l'alfa 2 antiplasmina està present en concentracions més baixes que el plasminogen i mentre que es continua produint plasmina, l'alfa 2 antitripsina va desapareixent (40).

2.4. ALTRES ELEMENTS REGULADORS DE L'HEMOSTÀSIA

2.4.1. Micropartícules circulants

Les micropartícules (MP) són petites estructures vesiculars sense nucli que s'alliberen per gemmació exofítica de la membrana plasmàtica de diferents tipus cel·lulars en resposta a l'activació cel·lular o a l'apoptosi (41–43). Segons la definició de consens del Scientific Subcommittee on Vascular Biology (SSC-VB) de la International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) les MP són “vesícules cel·lulars d'entre 0,1 i 1 μm de diàmetre que es troben en el plasma, procedents d'una àmplia varietat de cèl·lules, que no posseeixen nucli ni capacitat de síntesi, que poden tenir citoesquelet, i que contenen quantitats variables de fosfatidilserina i dels antígens de superfície de les cèl·lules de les quals procedeixen” (44).

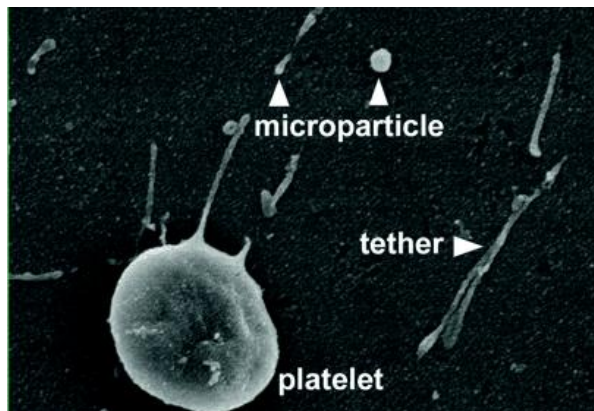


Figura 5. Mida relativa de les MP en comparació amb les plaquetes.

Extret de Jackson. *Blood*. 2006 (45).

Les MP, ja que contenen part dels efectors bioactius de les cèl·lules on s'han originat, poden modificar la funció vascular i poden induir respostes biològiques que participen en l'homeòstasi vascular (41). La majoria de MP a la sang humana s'originen a partir d'eritròcits i de plaquetes (42,43). Les MP també poden alliberar-se d'altres tipus cel·lulars, com són els leucòcits, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules de múscul llis, o les cèl·lules canceroses (44,46–50).

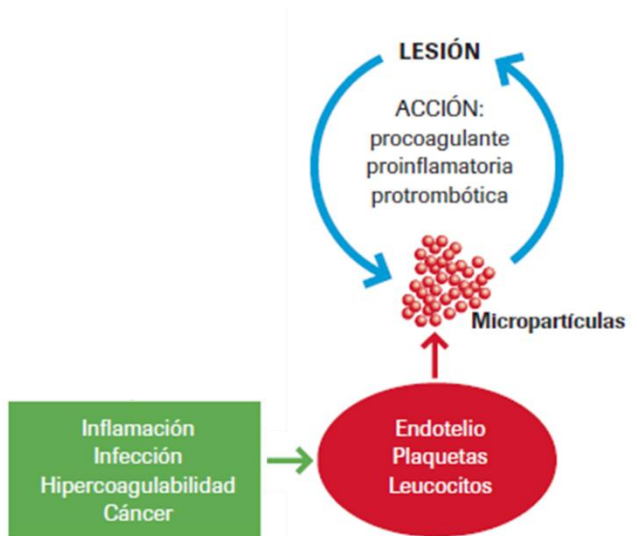
Les MP intervenen en processos fisiològics com l'hemostàsia, la inflamació i l'angiogènesi (43). El seu efecte biològic depèn sobretot de la seva composició en lípids i en proteïnes de membrana, que varien segons el tipus cel·lular del qual procedeixen. Característicament, les MP contenen fosfatidilserina a la seva membrana externa, un aminofosfolípid carregat negativament que habitualment es troba a la part interna de les membranes cel·lulars de les cèl·lules d'on provenen (44,51), proporcionant una superfície procoagulant que permet la unió dels components de les vies de la coagulació, alhora que poden exposar TF a la seva membrana, afavorint la formació de trombina i la coagulació (44). L'exposició de la fosfatidilserina de la superfície de les MP no només facilita la formació de complexos de coagulació, sinó que també promou la capacitat del TF per iniciar la coagulació en condicions normals (52). S'ha objectivat que les MP poden iniciar la coagulació, ja sigui a través del complex factor VII/ TF o bé de forma independent, sense necessitat de cap altre factor de coagulació (52). Durant el dany vascular, la sang entra en contacte amb el TF extravascular, activant-se i iniciant la coagulació i la formació de fibrina, però el TF també es pot activar quan les MP s'adhereixen i es fusionen amb les plaquetes activades, iniciant la coagulació d'aquesta manera (53).

INTRODUCCIÓ

A l'inrevés, a la superfície de les MP es pot trobar trombomodulina i proteïna C, així com TFPI, per la qual cosa també poden tenir una funció anticoagulant fisiològica (44,54,55). Aleshores, segons quina sigui la composició de les seves membranes, les MP poden comportar-se com pro o com anticoagulants, contribuint a la regulació de la coagulació. Possiblement, l'equilibri entre el TF i el TFPI a la superfície de les MP sigui una característica crucial per a la iniciació de la coagulació i, probablement les concentracions de TF de la superfície de les MP siguin majors que les de TFPI, de manera que l'efecte procoagulant del TF supera l'anticoagulant del TFPI (55).

Figura 6. Factors precipitants de la formació de MP i els seus efectes.

Figura reproduïda amb permís de JC Reverter.



Inicialment es va pensar que les MP estaven relacionades sempre amb malaltia, ja que expressaven fosfolípids, de caràcter procoagulant, i per tant eren generadores de trombosis i malaltia. Així, es va veure que les MP estan elevades en malalties trombòtiques que tenen lloc als llits venosos i arterials (56–59). Darrerament, però, s'ha objectivat que aquest sistema d'inici de la coagulació s'activa no només en estats de

malaltia, sinó també en individus sans (53). Berckmans et al (60) van observar que les MP en individus sans ajuden a la generació de trombina en un grau baix, i Sinauridze et al (60) van objectivar que les MP d'origen a les plaquetes de persones sanes tenen de 50 a 100 vegades més activitat procoagulant específica que les plaquetes activades.

a) Determinació de MP

La determinació de les MP al laboratori es complexa. Hi ha diverses tècniques que poden ser classificades en quatre grups: citometria de flux, quantificació de la capacitat procoagulant, mètodes d'ELISA de captura de les MP, microscòpia electrònica i noves metodologies. (Taula 1).

- Citometria de flux:

La citometria de flux és la metodologia més habitual. És relativament ràpida i permet la detecció simultània de múltiples marcadors antigènics amb els que es poden identificar diferents poblacions d'origen de les MP (61). La citometria de flux té l'inconvenient que no detecta les MP menors a 0,5 μm , encara que els instruments digitals més moderns i, sobretot, els nous citòmetres d'impedància són de més gran resolució (62). De tota manera, per aquesta limitació, les MP mesurades per citometria de flux són només una petita fracció de les que realment hi ha. És una tècnica cara, que precisa d'operadors especialitzats i la seva estandardització no és encara prou satisfactòria (62). Com a avantatges trobem que requereix d'un volum molt petit de mostra (44,63,64).

INTRODUCCIÓ

- Quantificació de la capacitat procoagulant:

La quantificació de la capacitat procoagulant es basa en la mesura de l'expressió de fosfolípids aniónics amb capacitat de contribuir a la generació de trombina a la superfície de les MP (65,66). La majoria d'aquestes tècniques són barates, es poden automatitzar i realitzen una avaluació global de la funció biològica de l'hemostàsia. Com a inconvenient no donen informació de la mida de les MP ni del seu origen (66). Aquests mètodes de quantificació de la capacitat procoagulant es veuen limitats per la necessitat d'obtenir un plasma realment lliure de MP.

- Mètodes d'ELISA de captura de les MP:

Els mètodes d'ELISA de captura de les MP es fonamenten a immobilitzar les MP a sobre d'una superfície recoberta d'annexina V, amb capacitat per unir-se a la fosfatidilserina de la superfície de les MP, dins d'un pouet d'una placa d'ELISA (62). Aleshores, les MP capturades es detecten o bé per anticossos monoclonals marcats en un assaig de tipus Sandwich, amb més sensibilitat que la citometria de flux per la detecció d'antígens dèbils (66), o bé per la quantificació funcional de la seva capacitat per suportar la coagulació. Aquesta mesura de la capacitat de suportar la coagulació es fa afegint factor II, factor V y factor X activats i calci iònic, activant la coagulació i, per tant, es pot determinar la capacitat procoagulant de les MP capturades (66,67). Els mètodes de captura són relativament barats i poden ser parcialment automatitzats (65,66). Igual que els mètodes de capacitat procoagulant, els mètodes d'ELISA de captura donen informació de la funcionalitat de les MP, però no de la seva mida ni del seu origen (62).

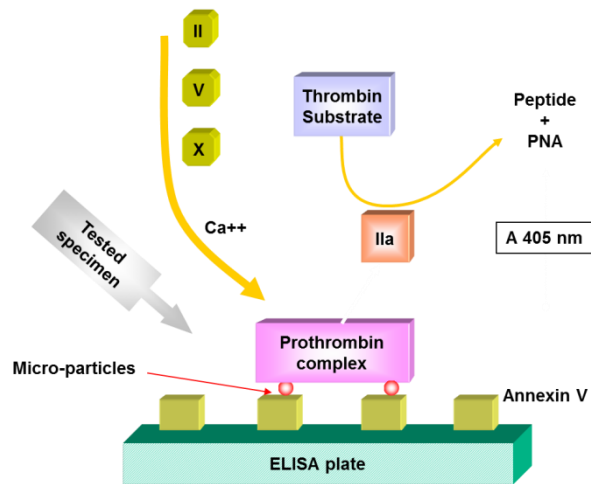


Figura 7. Mètode Elisa de determinació de MP.

Figura reproduïda amb permís de JC Reverter.

- Microscòpia electrònica

La microscòpia electrònica es pot fer servir també per avaluar les MP circulants.

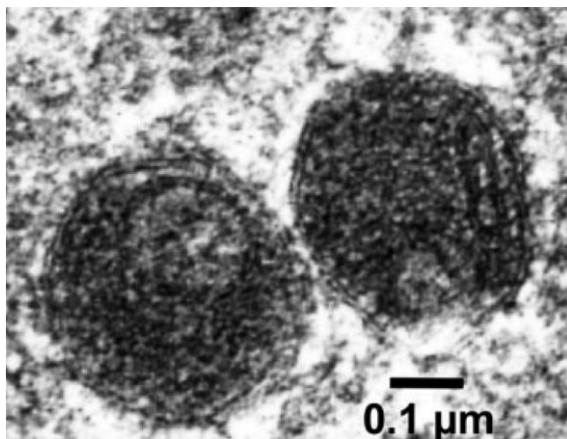


Figura 8. MP vistes per microscòpia electrònica.

Extret de Boulanger. *Hypertension*. 2006 (68).

La microscòpia electrònica pot mesurar no solament la mida, sinó també la forma i estructura interior. A més, es pot utilitzar una tinció immunològica que permeti

INTRODUCCIÓ

identificar l'origen de les MP i localitzar de forma precisa les diferents proteïnes que puguin tenir interès funcional (66). Com a inconvenient, la microscòpia electrònica és una tècnica cara i precisa d'operadors especialitzats (66). Com a tècnica complexa que és, poden produir-se artefactes durant la fixació, processament i tinció.

- Noves metodologies

A aquests mètodes s'hi ha afegit darrerament la possibilitat de la quantificació de les MP per Dinamic Light Scattering (DLS) i per microscòpia de força atòmica, que poden detectar MP de mida molt petita.

La tècnica de DLS permet avaluar de forma molt exacta MP de molt petita grandària. Està fonamentada en la mesura de les fluctuacions en la dispersió de la llum en diferents angles, produïda pel moviment brownià de les MP (69). Amb aquesta tècnica es pot mesurar la mida i analitzar els histogrames de distribució de mides, però no es poden analitzar els components estructurals ni la seva funció (66,69).

La microscòpia de força atòmica és una tècnica on les MP primer s'immobilitzen a una superfície mitjançant anticossos específics i, posteriorment, una sonda registra la topografia a nivell nanomètric (66). Amb aquest procediment s'analitzen les característiques antigèniques. Per la seva complexitat i cost és molt poc emprada.

Taula 1. Principals característiques dels mètodes per a la mesura de les MP circulants

	Citometria de flux	Quantificació de la capacitat procoagulant	Mètodes d' ELISA de captura de les MP	Microscòpia electrònica	Dinamic Light Scattering	Microscòpia de força atòmica
Quantificació	++	+++	+++	No	++	no
Origen cel·lular	+++	+	+	+	no	+
Especificitat	++	+	+	+++	no	++
Mida	+	No	no	++	++	+++
Automatitzable	++	+++	+++	no	+	no

En qualsevol cas, per totes les tècniques, la fase preanalítica és crucial per a la correcta determinació de les MP. Les recomanacions del subcomitè per biologia vascular de la ISTH indiquen que cal fer especial atenció en l'extracció de la mostra sanguínia pel que fa a la mida de l'agulla, l'ús de torniquet, el tipus d'anticoagulant usat, la preparació del plasma amb vigilància del temps transcorregut des de l'extracció, la centrifugació i congelació i descongelació dels espècimens (63,64,67,70).

b) MP en situacions patològiques

Les MP es troben augmentades a moltes situacions clíniques (71,72) incloent gairebé a totes les malalties trombòtiques que tenen lloc al territori venós o arterial (56–59), així com en situacions associades amb la inflamació, l'activació i disfunció cel·lular, i

INTRODUCCIÓ

l'angiogènesi (73–80). Les principals situacions clíniques en què s'han trobat MP augmentades en nombre són les següents: càncer, infeccions, malalties cardiovasculars, malalties autoimmunitàries, diabetis mellitus, hipertensió arterial greu, trombosis venosa profunda, embolisme pulmonar, infecció per virus de la immunodeficiència humana, anèmia falciforme, trombocitopènia induïda per heparina, preeclàmpsia, púrra trombòtica trombocitopènica, insuficiència renal i esclerosi múltiple (62).

- Arteriosclerosi, malaltia cardiovascular i MP

S'ha descrit que quan existeix arteriosclerosi hi ha una producció més elevada de MP derivades de plaquetes, cèl·lules endotelials i de leucòcits (81,82), i que aquestes MP tenen efectes funcionals sobre la malaltia aterotrombòtica (83). Aquestes MP circulants originades de plaquetes i leucòcits promouen el reclutament de cèl·lules inflamatòries, indueixen l'adhesió cel·lular i plaquetària a través de l'augment de citocines (84), afavoreixen el reclutament de plaquetes (83) i la infiltració de monòcits a les plaques d'ateroma (85), donant com a resultat final la formació de trombes. S'ha suggerit que la trombina que es forma al voltant dels coàguls inicials a les zones de dany vascular arterioscleròtic potencia la formació de MP plaquetàries procoagulants, les quals juguen un paper important en la propagació del trombe (86). Així doncs s'han objectivat elevacions de les MP en pacients amb síndrome coronari agut (83), ICTUs (87,88) i diabetis amb malaltia aterotrombòtica i malaltia arterial perifèrica ja establerta (89) entre d'altres.

El desenvolupament i la progressió de les plaques arterioscleròtiques s'associen amb la mort cel·lular apoptòtica, fet que causa la formació d'una gran quantitat de MP

procoagulants dins de les plaques (90). Aquestes MP atrapades dins les plaques d'arteriosclerosi tenen un potencial trombogènic encara major que les MP circulants. La majoria de MP que es troben dins les plaques són derivades de leucòcits activats, típic de les situacions d'inflamació (91), però també s'hi ha observat MP derivades de cèl·lules endotelials i de cèl·lules de múscul llis (90). Les MP no només contribueixen a l'augment d'aterogènicitat i risc trombòtic de la placa, sinó que, a més, n'augmenten el reclutament de cèl·lules inflamatòries, fet que contribueix a la seva inestabilitat. Així doncs, està descrit que les MP circulants poden produir inflamació vascular, disfunció endotelial, adhesió de leucòcits, i reclutament de cèl·lules inflamatòries. Tot això podria contribuir al creixement de la placa d'arteriosclerosi (92).

A l'aterosclerosi acostuma a haver-hi una elevada força de cisallament (definida com la força d'arrossegament que actua sobre les cèl·lules endotelials com a resultat del flux sanguini) i aquest augment de la força de cisallament pot iniciar l'agregació plaquetària i, alhora, la aparició de MP procoagulants (93), tant d'origen plaquetari (43,94–96) com endotelial (97,98).

S'ha observat que els pacients amb una síndrome coronària aguda presenten una elevació de les MP derivades de cèl·lules endotelials en comparació amb els pacients amb angina estable o amb els controls (99). També s'ha descrit que les MP derivades de cèl·lules endotelials estan més elevades en pacients que tenen lesions coronàries d'alt risc en comparació amb els que tenen lesions de baix risc (100).

D'aquesta manera, les MP estan implicades en el desenvolupament i progressió de la aterosclerosi, que és la causa subjacent de la malaltia cardiovascular (101,102). Fins i tot

INTRODUCCIÓ

s'ha descrit que podrien predir infarts de miocardi fins a tres anys abans que es produeixin, com s'ha estimat en un grup de pacients amb hipercolesterolèmia familiar (103).

S'ha proposat que les MP podrien ser considerades biomarcadors per al diagnòstic, valoració de l'activitat, predicció de la resposta al tractament i pronòstic de la malaltia cardiovascular aterotrombòtica (71).

- Diabetis Mellitus i MP

La Diabetis Mellitus és un dels principals factors de risc associats a l'aterosclerosi i malaltia cardiovascular. Les MP estan elevades en els pacients amb diabetis i el fenotip de les MP pot variar segons el tipus de diabetis que presenta el pacient (54,97,104). Un estudi va objectivar que el potencial procoagulant de les MP estava elevat en els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 i que es correlacionava amb el grau de control glucèmic. Altres estudis han objectivat que les concentracions de MP derivades de plaquetes i de monòcits es correlacionen amb les complicacions de la diabetis, incloent el grau de retinopatia diabètica (associada a dany microvascular) (105–111). L'elevació de les MP derivades de cèl·lules endotelials en pacients diabètics és predictiu de lesions d'artèries coronàries, i podria comportar-se com un factor de risc independent, fins i tot més potent que la durada de la diabetis, les concentracions de lípids o la presència d'hipertensió arterial (112). L'elevació de les MP derivades de cèl·lules endotelials en diabètics pot servir per identificar una subpoblació de pacients sense clínica anginosa, però amb alta probabilitat de presentar lesions coronàries a l'angiografia.

- Càncer i MP

El càncer és una entitat associada amb hipercoagulabilitat i risc elevat de trombosi, de predomini venós, però també arterial, fet que influeix negativament en la seva morbimortalitat. En els pacients amb càncer, les MP poden originar-se tant de les pròpies cèl·lules tumorals com de cèl·lules endotelials, monòcits i plaquetes (62). Està descrit que les MP participen en l'angiogènesi, en transportar factors de creixement (62), promouen la progressió del càncer i la disseminació en forma de metàstasis (62,113). En el cas de pacients amb càncer de pulmó i de mama s'ha objectivat que les MP indueixen metàstasi i augment de l'angiogènesi, i poden ser bons biomarcadors de possibles complicacions vasculars.

2.5 HIPOTIROÏDISME, MALALTIA CARDIOVASCULAR I COAGULACIÓ

“There was edema of the skin... much serous effusion in the pericardium... the heart was large... the arteries were everywhere thickened, the largest ones atheromatous” [Dr. William Smith Greenfield, Autopsy findings in a 58 year old woman with myxoedema, 1878] (114).

2.5.1. Hipotiroïdisme subclínic, malaltia cardiovascular i trombosi

Cada vegada més estudis relacionen l'hipotiroïdisme subclínic amb l'augment de risc cardiovascular i l'augment de mortalitat del mateix origen. Diferents estudis han demostrat que l'hipotiroïdisme subclínic pot provocar insuficiència cardíaca (115–117) i major progressió de la disfunció ventricular en aquells que ja presenten la malaltia cardíaca, quan es comparen amb un grup de pacients amb funció tiroïdal normal (118,119), major risc d'aterosclerosi i d'episodis de malaltia coronària. Tot aquest efecte s'ha demostrat més evident en aquells pacients que presenten una TSH ≥ 10 mU/L (120).

Els mecanismes implicats en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic no estan del tot clars. La dislipèmia (121), l'elevació de la tensió arterial (122), un estat d'hipercoagulabilitat (123), l'efecte directe de la TSH sobre el seu receptor endotelial augmentant l'angiogènesis (124)(124,125) o sobre el seu receptor del miòcit cardíac (126), o fins i tot de l'elevació de les MP apoptòtiques (120,127) són els causant d'aquest augment de risc i mortalitat cardiovascular.

2.5.2. Hipotiroïdisme clínic, malaltia cardiovascular i trombosis

Des de fa anys, es reconeix que un dels principals efectes de l'hipotiroïdisme clínic és l'afectació del sistema cardiovascular.

La disminució de les hormones tiroïdals perifèriques (T3 i T4) actuen sobre la funció cardíaca i l'hemodinàmica cardiovascular, produint, entre d'altres, augment de la

resistència vascular perifèrica, insuficiència cardíaca, malaltia coronària arterial, resistència a la insulina, inflamació, aterosclerosi i reducció de la freqüència cardíaca (128). Aquest augment de malaltia cardiovascular s'ha explicat bàsicament per la disminució de les hormones tiroïdals perifèriques (T3 i T4) (128), que provoquen un clar augment del colesterol (129) i hipertensió diastòlica (128), a part de l'efecte directe de la T3 i T4 sobre el seu receptor al miòcit cardíac i la vascularització perifèrica (128).

Totes aquestes alteracions són potencialment reversibles si s'inicia tractament substitutiu amb hormona tiroïdal (128).

2.5.3. Hipotiroïdisme subclínic i coagulació

L'hipotiroïdisme subclínic pot estar relacionat amb algunes alteracions de l'hemostàsia. Alguns estudis mostren un estat d'hipercoagulabilitat a l'hipotiroïdisme subclínic (130–135), però d'altres, contràriament, observen una tendència a la hipocoagulabilitat (136) o cap canvi respecte als pacients amb normofunció tiroïdal (137,138). Això pot ser degut, en bona part, als diferents paràmetres considerats, a diferències en la metodologia feta servir i en els subgrups de pacients amb hipotiroïdisme reclutats.

L'estat d'hipercoagulabilitat de l'hipotiroïdisme subclínic ha restat objectivat per un augment del fibrinogen, del factor VII:C, de la ràtio factor VII:C/factor VII antigen, de l'augment del PAI-1 i de disminució de la concentració de l'antitrombina (130,131,134). Muller et al. (131) van observar en pacients amb hipotiroïdisme subclínic un augment de la ràtio del factor VII coagulant/factor VII antigen, cosa que podria reflectir la presència de quantitats més grans de factor VII activat, el qual, juntament amb el TF ,

INTRODUCCIÓ

és capital en l'inici fisiològic de la coagulació (24), alhora que activa la coagulació a través de les MP (139). Guldiken et al. (133) van descriure que la capacitat fibrinolítica estava disminuïda als pacients amb hipotiroïdisme subclínic, Akinci et al. (132) van objectivar una elevació de l'antigen del TAFI en pacients amb hipotiroïdisme subclínic, cosa que causaria hipofibrinòlisi, i Lupoli et al. (135), en 41 pacients amb hipotiroïdisme subclínic abans i després del tractament hormonal substitutiu amb levotiroxina, van demostrar que abans del tractament hi havia uns valors més elevats de factor VII, de PAI-1 i del tPA, els quals disminuïen després del tractament amb levotiroxina durant 6 mesos. Tots els resultats són de caràcter procoagulant.

Per altra banda, hi ha resultats que suggereixen un estat d'hipocoagulabilitat i de risc hemorràgic en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic. Així, Gullu et al. (136) van observar discrets canvis amb disminució en els nivells de factor VIII i de factor von Willebrand, que eren reversibles quan se subministrava tractament amb levotiroxina.

Altres estudis no han objectivat diferències en l'estat de la coagulació entre pacients amb hipotiroïdisme subclínic i pacients eutiroidals. Anagnostis et al. (137) no van trobar diferències en l'antitrombina, la proteïna C, la proteïna S o el fibrinogen a l'hipotiroïdisme subclínic. Així mateix, Akinci et al. no van objectivar diferències en els valors de t-PA, TFPI (lliure i total) o PAI-1 (138) entre els pacients amb hipotiroïdisme subclínic i els eutiroidals. Finalment, en el 5th Tromsø study (140), no es van trobar diferències significatives entre els valor de factor VII ni de factor VII activat en una població de pacients amb hipotiroïdisme subclínic comparats amb controls sans.

Berezin et al (141) van descriure la possible associació entre l'hipotiroïdisme subclínic i les MP endotelials en pacients amb insuficiència cardíaca crònica. De forma retrospectiva, en una població de 388 pacients amb insuficiència cardíaca crònica, en van diagnosticar 53 amb hipotiroïdisme subclínic (tots ells amb valors de TSH >10mUI/L i T4 lliure normal) i van objectivar que presentaven una alteració del patró de MP endotelials circulants, bàsicament amb un augment del nombre de MP endotelials apoptòtiques. De tota manera, l'associació era dèbil i fins i tot desapareixia quan s'ajustava per marcadors d'insuficiència cardíaca.

Finalment, el 2018, Tomczyńska M et al. (142) van estudiar 25 pacients amb tiroïditis de Hashimoto i 59 amb malaltia de Graves. L'avaluació de les MP d'origen plaquetari va ser per citometria de flux i van estudiar també l'activació plaquetària. Van observar un augment de entre 2 i 2,5 vegades de les MP d'origen plaquetari a la tiroïditis de Hashimoto. Els autors opinen que a les malalties tiroïdals autoimmunes les MP poden causar una situació d'inflamació crònica i, a més, poden interaccionar amb els autoanticossos circulants i amb el complement (C1q) contribuint a la formació d'immunocomplexos, els quals poden desencadenar la resposta immune (143).

2.5.4. Hipotiroïdisme clínic i coagulació

També hi ha discrepàncies sobre l'efecte de l'hipotiroïdisme clínic en la coagulació: uns objectiven hipocoagulabilitat, altres hipercoagulabilitat.

En els primers estudis es va descriure una tendència a l'hemorràgia en els pacients amb hipotiroïdisme clínic (144–146). Alguns estudis més recents objectiven la mateixa

INTRODUCCIÓ

tendència (136,147–149). Així, s'ha observat que els pacients amb hipotiroïdisme clínic presentaven concentracions disminuïdes dels factors VIII, IX i XI, estat que conferiria una disminució de la capacitat de coagulació, i que aquests factors augmentaven quan s'iniciava tractament amb levotiroxina (144,145). Bennett et al. van observar que l'hipotiroïdisme clínic s'associava a hiperfibrinòlisi amb un augment del plasminogen i del PAI-1 (146). Verkleij et al. (149), en 20 pacients amb hipotiroïdisme clínic abans de començar tractament, van objectivar que tenien disminuït el temps de lisi del coàgul en comparació amb ells mateixos després d'assolir un estat eutiroïdal. Un altre estudi (150), continuació de l'anterior, va mostrar una menor absorbància màxima del coàgul, un temps de lisi del coàgul més curt i la presència de coàguls menys compactes (avaluats per microscòpia electrònica). També, i com a possibles causes, van trobar que les determinacions de fibrinogen i de PAI-1 eren baixes. En la mateixa línia d'un estat de major risc de sagnat, Gullu et al. (136) van identificar en 15 pacients amb hipotiroïdisme clínic un allargament del temps de protrombina i del temps de tromboplastina parcial activat (APTT), així com una disminució del factor VIII i del factor von Willebrand activitat. Palareti et al. (151) van estudiar 21 pacients amb hipotiroïdisme adquirit després de tiroïdectomia, i van trobar una agregació plaquetària disminuïda. Totes les alteracions descrites als diferents estudis revertien després del tractament amb levotiroxina. Yango et al. (152) van objectivar hipocoagulabilitat en 22 pacients que havien estat tiroïdectomitzats i que havien abandonat el tractament amb levotiroxina durant 4-6 setmanes per sotmetre's a un rastreig corporal total amb radioiodo. En ells van observar que després de la supressió del tractament estaven disminuïts el factor VIII, el factor von Willebrand col·lagen binding activity i el factor von Willebrand antigen

mentre que l'APTT estava allargat. Aquestes alteracions no es corregien a les 6-8 setmanes de reinstaurar el tractament amb levotiroxina. Finalment, també s'ha assenyalat la possible associació amb la síndrome de von Willebrand adquirida. Stuijver et al. van objectivar en una cohort de 90 pacients amb hipotiroïdisme clínic una sorprenentment elevada prevalença de la síndrome de von Willebrand adquirida del 33% (153).

No obstant això, altres estudis han suggerit un estat d'hipercoagulabilitat o hipofibrinòlisi en els pacients amb hipotiroïdisme clínic (130,132,154–157). Chadarevian et al., en un primer estudi (130), van observar que les concentracions de tiroxina lliure tenien una correlació inversa amb les concentracions de dímer D, de factor VII, de factor VIII i del PAI-1, i en un segon estudi van descriure un augment del fibrinogen (155). En aquest mateix sentit, Akinci et al. (132), Cetinkalp et al. (156), i Erem et al. (158), en tres estudis diferents, van descriure en un grup de pacients amb hipotiroïdisme clínic un augment de l'antigen del TAFI. Erem et al. també van descriure una augment del factor VII i de la trombomodulina, disminució del factor VIII, el factor von Willebrand, les proteïnes C i S i el TFPI (158), i augment del fibrinogen, d'antitrombina i de PAI-1 en comparació amb el controls sans (159).

La controvèrsia arriba fins a separar l'efecte de l'hipotiroïdisme sobre l'hemostàsia en funció de si aquest és clínic o subclínic. Revisions sistemàtiques proposen un estat hipocoaguable per hipotiroïdisme clínic i un d'hipercoaguable a l'hipotiroïdisme subclínic (160,161).

2.6. TSH HUMANA RECOMBINANT (rhTSH) I COAGULACIÓ

És ben conegut que la TSH és l'hormona sintetitzada a la hipòfisi i que té receptor a la glàndula tiroïdal. Darrerament, però, diferents estudis, ja en humans, han demostrat la presència de receptors funcionals de la TSH a altres òrgans a part de la glàndula tiroïdal, com són les cèl·lules endotelials (162), les cèl·lules de múscul llis de les artèries coronàries (163), els cardiomiòcits (164) o les cèl·lules del moll d'os (165), entre altres. Aquests receptors de la TSH extratiroidals podrien explicar en part els efectes de l'hipotiroïdisme i, principalment, en l'hipotiroïdisme subclínic on les hormones perifèriques T3 i T4 són normals i l'únic que es modifica és la TSH que es troba elevada.

En humans es coneix poc sobre els efectes de la TSH sobre aquests receptors extratiroidals. Un bon model on avaluar l'efecte directe de la TSH sobre els seus receptors sense que hi hagi influència de les hormones perifèriques és en els pacients amb carcinoma de tiroide que seran exposats a rhTSH per realitzar un rastreig corporal total amb radioiode, on la TSH augmenta sense variar les concentracions de T3 lliure i T4 lliure (7). Hi ha, però, pocs estudis que valorin la relació entre l'administració de rhTSH i els seus efectes sobre la coagulació. Desideri et al. (166) van avaluar els canvis en les concentracions de les formes solubles de l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) i d'E-selectina (ambdós indicadors d'activació de l'endoteli), de P-selectina soluble i de CD40L (ambdós indicadors d'activació plaquetària) en 20 pacients amb càncer de tiroide lliures de malaltia i sotmesos a rhTSH i comparats amb 20 controls. Després de la injecció de rhTSH es va observar un augment significatiu les concentracions de totes les molècules estudiades, conclouent que la injecció de rhTSH s'associa a una activació

proaterogènica de l'endoteli vascular i de les plaquetes. A partir d'aquestes dades, els autors plantegen la hipòtesi que la TSH pot tenir un paper rellevant en l'aparició de dany ateroscleròtic precoç en pacients amb hipotiroïdisme. Per la seva banda, Debeij et al. (157) no van trobar cap canvi en les concentracions del factor II, VIII o IX, ni en les concentracions d'antitrombina, proteïna S, fibrinogen, complexos TAT ni F1+2 1en un grup de 17 pacients amb carcinoma de tiroide curat exposats a rhTSH, conclouent d'aquesta manera, al contrari que l'anterior, que l'elevació de TSH per si mateixa no sembla tenir efectes en la coagulació. Finalment, Yango et al. (152) no van trobar modificació dels paràmetres estudiats (plaquetes, fibrinogen, temps de trombina, temps de protrombina, temps de tromboplastina parcial activat, factor VIII i factor von Willebrand antigen) en 30 pacients exposats a rhTSH.

Fins el moment actual únicament hi ha un estudi realitzat sobre l'efecte de la rhTSH i les MP. Burger et al. (167), el 2015, van realitzar un estudi on l'objectiu era determinar si l'administració de rhTSH alterava les concentracions de MP totals (mesurades per citometria de flux), la seva activitat procoagulant (mesurada a través de la presència de fosfatidilserina a la seva superfície) i quantificava les d'origen endotelial. Van estudiar una població de 18 persones i van objectivar que hi havia un augment després de la injecció de rhTSH de les MP totals (1.6 vegades el dia 3 i 1.9 el dia 5) i de la seva activitat procoagulant (1.5 vegades el dia 3 i 1.9 vegades el dia 5) en comparació amb la quantitat basal. Al no haver-hi canvis en els valors de les MP endotelials, els va fer concloure que la resposta a la rhTSH podia ser deguda, bàsicament, a les MP d'origen plaquetari.

3- HIPÒTESI

Els pacients amb hipotiroïdisme pateixen més arteriosclerosi i patologia trombòtica més elevada de la que es podria esperar per la seva edat, sexe i factors de risc cardiovascular. Aquesta major presència de malalties vasculars i trombòtiques s'ha suposat que podria estar relacionada amb una modificació del perfil de la coagulació, originant un estat protrombòtic latent. La demostració d'aquesta hipercoagulabilitat no s'ha assolit encara de forma satisfactòria per raons de la insuficient estructuració i variabilitat de la interpretació de la funció fisiològica que detecten els marcadors que fins ara s'han pogut fer servir. El desenvolupament de nous marcadors, més sensibles i específics dels diferents passos de l'hemostàsia que es suporten en els coneixements actuals de noves vies activadores i reguladores, pot permetre afinar el coneixement de l'hemostàsia a l'hipotiroïdisme. Podem suposar que amb els nous marcadors per a l'exploració de l'hemostàsia es podria clarificar la situació d'hipercoagulabilitat o no hipercoagulabilitat en aquesta entitat clínica, i a quina o quines vies promotores o reguladores pot afectar.

Així mateix, la controvèrsia sobre l'efecte que pot exercir en l'hemostàsia l'administració d'hormones tiroïdals, com tractament substitutiu, tampoc està satisfactòriament resolta. Encara que la majoria d'estudis apunten a una normalització pel tractament dels paràmetres prèviament alterats, altres estudis, fent servir marcadors d'hipercoagulabilitat diferents, troben uns resultats oposats. Podem suposar que una determinació més afinada de la situació de l'hemostàsia, tant basal com després d'un període de tractament, feta amb els nous marcadors podria donar llum a les controvèrsies encara presents. És d'esperar que amb l'ús d'aquestes noves tècniques s'aconsegueixi identificar quins són els passos de l'hemostàsia, si és que n'hi ha, que es normalitzen amb el tractament i quins altres no.

HIPÒTESI

Per una altra banda, actualment no es coneix si les alteracions de l'hemostàsia que fins ara s'han identificat, i les que es poden trobar en el futur amb nous marcadors, són conseqüència de l'efecte de l'augment de les hormones tiroïdals, o de l'augment de la TSH o de totes dues causes. Una situació clínica especial, la del pacient tiroidectomitzat per carcinoma diferenciat de tiroide, està sota tractament amb levotiroxina i que s'exposa a l'administració de TSH humana recombinant, podria fer-se servir com un model quasi experimental per aclarir l'efecte agut de l'increment de la TSH.

4- OBJECTIUS

4.1. OBJECTIU PRINCIPAL:

- Estudiar l'estat de la coagulació i la fibrinòlisi en pacients en situació d'hipotiroïdisme subclínic, hipotiroïdisme clínic i en pacients abans i els primers 10 dies després de l'administració de rhTSH fent servir nous marcadors de l'hemostàsia.

4.2. OBJECTIUS SECUNDARIS:

- Avaluat la relació dels marcadors de l'hemostàsia amb els valors d'hormona tiroïdal i de TSH.
- Valorar l'efecte sobre la coagulació i la fibrinòlisi del tractament amb levotiroxina en pacients amb hipotiroïdisme clínic i subclínic fent servir nous marcadors de l'hemostàsia.

5- PACIENTS I MÈTODES

5.1. ESTUDI 1: EFECTES DE L'ELEVACIÓ DE LA TSH PER HIPOTIROÏDISME SUBCLÍNIC I CLÍNIC SOBRE PARÀMETRES DE LA COGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS.

5.1.1. Població de l'estudi

a) Grup de pacients amb hipotiroïdisme subclínic

Es van incloure pacients amb hipotiroïdisme subclínic procedents de les consultes externes d'Endocrinologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, segons ordre de visita, al llarg de 3 mesos.

Criteris d'inclusió:

- presentar una TSH per sobre del límit alt de la normalitat (normalitat entre 0.3 i 5.5 $\mu\text{U/mL}$).
- presentar una T4 lliure dins del rang de la normalitat (normalitat entre 0.6 i 1.8 ng/dL).

Criteris d'exclusió:

- presentar qualsevol malaltia associada que pugui influir en l'hemostàsia (com càncer actiu, insuficiència renal crònica o diabetis mellitus).
- antecedents de trombosi arterial o venosa o de trombofília coneguda.

PACIENTS I MÈTODES

- prendre fàrmacs que puguin influir en la funció tiroïdal (com corticoides, liti o amiodarona), fàrmacs que poguessin influir en el perfil de lípids (com estatines) o que poguessin influir en l'hemostàsia (com cumarínics o heparina).

Els pacients van ser reclutats després de donar el seu consentiment informat.

Els pacients que complien criteris de tractament segons les guies de pràctica clínica (1) van rebre tractament hormonal substitutiu amb levotiroxina sòdica amb l'objectiu de normalitzar les concentracions de TSH.

Els pacients van ser reavaluats als 6 mesos de l'inici del tractament.

b) Grup de pacients amb hipotiroïdisme clínic

Es van incloure pacients amb hipotiroïdisme clínic procedents de les consultes externes de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, segons ordre de visita, al llarg de tres mesos.

Criteris d'inclusió:

- presentar una TSH per sobre del límit alt de la normalitat (normalitat entre 0.3 i 5.5 $\mu\text{U/mL}$).

- presentar una T4 lliure per sota del límit de la normalitat (normalitat entre 0.6 i 1.8 ng/dL).

Criteris d'exclusió:

- presentar qualsevol malaltia associada que pugui influir en la coagulació (com càncer actiu, insuficiència renal crònica o diabetis mellitus).
- antecedents de trombosi arterial o venosa o de trombofília coneguda.
- prendre fàrmacs que puguin influir en la funció tiroïdal (com corticoides, liti o amiodarona), fàrmacs que puguin influir en els lípids (com estatines) o que puguin influir en l'hemostàsia (com cumarínics o heparina).

Els pacients van ser reclutats després de donar el seu consentiment informat.

Tots els pacients del grup van rebre tractament substitutiu amb levotiroxina sòdica segons les guies de pràctica clínica (1) amb l'objectiu de normalitzar les concentracions de TSH, essent reavaluats als 6 mesos de tractament.

c) Grup control

Es va seleccionar un grup control per a la comparació de les variables clíniques i analítiques. Aquests subjectes van ser similars en edat, sexe i ètnia als pacients inclosos a l'estudi.

Els controls van ser subjectes sans, voluntaris, pertanyents al personal sanitari de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, així com familiars dels pacients inclosos en els grups a estudi, sense malaltia relacionada amb la coagulació, sense diabetis mellitus ni dislipèmia, i sense càncer ni malaltia tiroïdal.

PACIENTS I MÈTODES

Criteris d'exclusió:

- presentar qualsevol malaltia associada que pugui influir en la coagulació (com càncer actiu, insuficiència renal crònica o diabetis mellitus).
- antecedents de trombosi arterial o venosa o de trombofília coneguda.
- prendre fàrmacs que puguin influir en la funció tiroïdal (com corticoides, liti o amiodarona), fàrmacs que poguessin influir en els lípids (com estatines) o que poguessin influir en l'hemostàsia (com cumarínics o heparina).
- tenir patologia tiroïdal de qualsevol origen.

Els subjectes del grup control van ser reclutats després de donar el seu consentiment informal.

5.1.2. Mètodes

a) Dades clíniques

Es van recollir les característiques clíniques següents, tant dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic, com dels subjectes sans:

- Edat
- Sexe
- Índex de massa corporal

·Hipertensió arterial

·Tabaquisme actiu

b) Avaluació dels paràmetres bioquímics, hormonal i de l'hemostàsia.

- Fase preanalítica.

L'extracció de sang es va realitzar sense venoclusió, al matí, en dejuni, amb l'individu assegut després d'un repòs mínim de 30 minuts.

En el cas dels pacients amb malaltia tiroïdal, l'obtenció de mostres va ser realitzada en el moment del diagnòstic. La determinació, després de rebre tractament substitutiu amb levotiroxina, en els que van rebre tractament, es va realitzar als 6 mesos, quan presentaven ja una funció tiroïdal completament normalitzada sota tractament, aprofitant una visita de control programada per avaluació de l'efecte de la medicació.

Es van obtenir les mostres de sang per punció venosa en tubs de polipropilè amb citrat sòdic al 3.8% (1/9, vol/vol) (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, Estats Units). Alhora, a la mateixa punció venosa, es van obtenir mostres en tubs sense additius (Becton Dickinson) per a fer els estudis analítics bioquímics i hormonal

Els tubs de sang obtinguda en citrat es van centrifugar immediatament (10 min, 20°C, 2.000 g) per a l'obtenció de plasma pobre en plaquetes per a realitzar-ne les determinacions d'hemostàsia. Una part del plasma obtingut en citrat es va sotmetre a una segona centrifugació (10 min, 4°C, 5.000 g) per a obtenir plasma lliure en plaquetes per a les determinacions de micropartícules.

PACIENTS I MÈTODES

Les mostres en tubs sense additiu, per a obtenir-ne sèrum, es van deixar coagular i es van centrifugar (15 minuts, 4°C, 3.000 g), per a realitzar els estudis bioquímics i hormonal.

Totes les mostres van ser fetes servir immediatament per a les determinacions analítiques i, per a les que es van fer en diferit, el plasma obtingut es va congelar immediatament a -80°C. Totes les mostres van ser processades o congelades en un temps màxim de 4 h des de la seva obtenció. Les mostres processades en diferit no van ser sotmeses a cicles de congelació descongelació perquè es van conservar en alíquotes de petit volum (100 µL). Les proves d' hemostàsia van ser realitzades sense conèixer a quin grup pertanyia cada mostra. Els paràmetres es van determinar per duplicat i, quan va caldre per discrepància en el resultat, es van reavaluar. No hi va haver mostres no determinades.

- Fase analítica.

Paràmetres bioquímics :

·Glucosa

·Creatinina

·Colesterol

·LDL Colesterol

·HDL Colesterol

·Triglicèrids

- Aspartat aminotransferasa (ASAT)

- Lactat deshidrogenasa (LDH)

La glucosa, la creatinina, el colesterol, els triglicèrids, la LDH i l'ASAT es van determinar per mètodes de rutina amb un autoanalitzador Shimadzu CL-7300 (Izasa, Barcelona, Espanya).

Paràmetres hormonals:

- TSH

- T4 lliure

- Anticossos antiperoxidasa (aTPO)

- Anticossos antitiroglobulina (aTg)

La TSH i T4 lliure sèriques es van mesurar utilitzant un assaig quimioluminiscent (Chiron Diagnostics ACS Centaur; Chiron Corporation, Emeryville, CA, Estats Units).

Els anticossos antiperoxidassa i antitiroglobulina es van avaluar mitjançant un assaig immunoradiomètric-*IRMA*- (BioCode TMAb i TgAb; Applied BioCode, Santa Fe Springs, CA, Estats Units).

Paràmetres de l'hemostàsia:

- Temps de protrombina

- Temps de tromboplastina parcial activat (APTT)

- Fibrinogen

PACIENTS I MÈTODES

- Factor VII coagulant
- Antitrombina
- Proteïna C
- Proteïna S lliure
- t-PA
- PAI-1 activitat
- PAI-1 antigen
- Plasminogen
- F1+2
- TAT
- Dímer D
- Trombomodulina
- Inhibidor de la via del TF
- Factor VII activat
- Expressió induïda de TF en monòcits
- Activitat procoagulant induïda en cèl·lules sanguínies mononucleades
- Micropartícules procoagulants

El temps de protrombina i l'APTT es van determinar amb un coagulòmetre automatitzat (Siemens, Marburg, Alemanya), utilitzant reactius estàndard (Siemens) i es van expressar com a proporcions (temps del pacient / temps mitjà de la població sana). El fibrinogen es va mesurar per la tècnica de la Clauss (Siemens) (168). L'activitat coagulant del factor VII (VII:C) es va determinar mitjançant un assaig de coagulació d'una etapa utilitzant tromboplastina estàndard (Siemens) i plasma humà deficient en factor VII (Siemens).

L'activitat de la proteïna C i de l'antitrombina es van mesurar mitjançant assaigs colorimètrics (Siemens) (169,170). La proteïna S lliure i el t-PA es van mesurar mitjançant tècniques d'ELISA (Stago, Asnières, França) (171,172).

El PAI-1 i l'activitat de plasminogen es van quantificar per assajos cromogènics (Chromogenix; Diapharma, West Chester, OH, Estats Units) (173,174). L'antigen del PAI-1 es va avaluar per ELISA (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, França) (175).

Les concentracions plasmàtiques dels marcadors de la generació de trombina fragment 1 + 2 de la protrombina i el TAT es van quantificar per ELISA (Enzygnost-F1+2 i Enzygnost-TAT, Siemens) (176,177). Les concentracions del marcador de degradació de la fibrina estabilitzada, el dímer D, van ser mesurades mitjançant ELISA (Stago, Asnières, França).

La trombomodulina i el TFPI es van mesurar per mètodes ELISA (Stago i American Diagnostica, Greenwich, CT, EUA, respectivament) (178,179).

El factor VII activat es va mesurar per un assaig de coagulació (Stago) usant TF soluble recombinant (corresponent a la porció extracel·lular del TF natiu). El TF soluble recombinant pot produir la coagulació del plasma en presència de factor VII activat, de

PACIENTS I MÈTODES

fosfolípids i de Ca^{+2} , però no pot activar el factor VII a factor VII activat (180,181). Les concentracions de factor VII activat es van expressar en mU/ml, utilitzant un patró de calibratge enfront d'un estàndard secundari derivat del primer International Standard Factor VIIa Concentrate (89/688, NIBCS).

L'expressió induïda de TF en monòcits normals es va realitzar com es descriu a l'article de Reverter et al. (182). Resumint, es van aïllar cèl·lules sanguínies mononucleades de sang anticoagulada amb citrat, fosfat i dextrosa (CPD; concentració final de citrat 19 mmol/L) obtinguda de voluntaris sans amb grup sanguini O. L'aïllament es va fer per sedimentació en un gradient de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Suècia). Després d'un rentat en PBS (phosphate buffered saline) a pH 7,2 (Bio-Mérieux, Marcy-l'Étoile, França), es van incubar les cèl·lules mononucleades durant 6 hores a 37°C en mostres de plasma de pacients o de controls (concentració final 20×10^6 cèl·lules/mL). Després de la incubació, les cèl·lules mononucleades es van rentar dues vegades amb PBS a pH 7,2, afegint-hi albúmina de sèrum boví a l'1% (Sigma) i sèrum humà AB a l'1%, inactivat per calor, i es van incubar durant 30 minuts a 22°C conjuntament amb un anticòs monoclonal anti-CD14 marcat amb ficoeritrina (LeuM3; Becton Dickinson) i amb un anticòs monoclonal contra el TF marcat amb fluoresceïna (American Diagnostica). La unió no específica es va avaluar mitjançant un anticòs monoclonal irrellevant del mateix isotip marcat amb fluoresceïna. La citometria de flux es va realitzar en un citofluorimetre (Becton Dickinson). Es van determinar els monòcits mitjançant dispersió frontal (Forward Scatter), dispersió lateral (Side Scatter) i finestra de fluorescència per ficoeritrina (de 585 nm de fluorescència). L'expressió del TF es va llegir amb fluorescència per fluoresceïna (a 530 nm de fluorescència) i es van recollir les dades un

mínim de 5×10^3 monòcits en l'amplificació logarítmica. L'anàlisi dels histogrames de doble color es va fer fixant el negatiu de la població control en menys de 0.5% cèl·lules positives. Es va recollir el percentatge de monòcits positius per factor tissular en percentatge (%TF).

L'activitat procoagulant induïda en cèl·lules sanguínies mononucleades normals es va determinar per un assaig coagulatiu d'una etapa en la superfície de cèl·lules viables, com s'ha descrit prèviament (182). Per resumir, es van obtenir cèl·lules sanguínies mononucleades de la manera que s'ha indicat a la determinació de l'expressió induïda de TF en monòcits normals. Després de la incubació dels monòcits amb els plasmes dels pacients o dels controls (6 hores, 37°C), es van rentar les cèl·lules mononucleades amb PBS a pH 7,2 (Bio-Mérieux), es van resuspendre (concentració final 10^6 cèl·lules mononucleades/mL) en PBS a pH 7,2, i es van usar en l'assaig de coagulació. En l'assaig, es van incubar (1 min, 37°C) en plasma humà obtingut en citrat, lliure de plaquetes (procedent de una barreja de vint donants normals), o bé 100 µL de la suspensió de cèl·lules mononucleades, o bé 100 µL d'estàndard de tromboplastina. La coagulació es va iniciar mitjançant l'addició de 100 µL de CaCl_2 (25 mmol/L,) i el temps de coagulació es va registrar en un sistema KC10 (Siemens). La corba estàndard es va generar amb dilucions seriades de tromboplastina de placenta humana (Siemens) (10^5 mU assignades a un pes en sec de 40 mg de tromboplastina/mL) en una corba log-log estàndard. Els resultats es van expressar com mU/ 10^5 monòcits. L'activitat procoagulant induïda en cèl·lules sanguínies mononucleades es va reduir en un 88% amb la incubació de les cèl·lules (2 h, 37°C) amb 50 µg/mL d'un anticòs monoclonal anti-TF amb capacitat de bloqueig (American Diagnostica) (182).

PACIENTS I MÈTODES

Les MP procoagulants es van mesurar per un assaig de captura en plaques d'ELISA, basat en la propietat de l'annexina V (adherida a les plaques) d'unir-se a la fosfatidilserina de les MP circulants dipositades als pouets (Hyphen BioMed). La mesura es va basar en l'activació de la capacitat protrombinasa a la superfície de les MP adherides amb l'addició als pouets de factors bovins X activat i V activat i de protrombina humana. Després d'incubar, es va quantificar la trombina generada amb un substrat cromogènic específic per a aquesta. Es va aturar la reacció amb àcid cítric al 2% abans de procedir a la seva lectura, mesurant l'absorbància a 405 nm. Les MP procoagulants es van determinar per duplicat i es van expressar com equivalents de nanomolar de fosfatidilserina (nM PS eq). El límit de detecció de la tècnica està establert en 0.05 nM PS eq. Al laboratori, el coeficient de variació intra-assaig va ser del 5% i el inter-assaig del 8%.

c) Consentiment informat

Els estudis es van realitzar en conformitat amb la Declaració d'Hèlsinki i van ser aprovats pel Comitè local d'Investigació Ètica Humana de l'Hospital Germans Trias i Pujol. Tots els participants van donar el seu consentiment informat abans de ser inclosos en l'estudi.

d) Anàlisi estadística

L'anàlisi es va portar a terme a partir de l'exportació des d'una base de dades en Excel, amb un registre unívoc per pacient, que va ser anonimitzat en aquest procés.

Las variables contínues s'han expressat amb la mitjana \pm desviació estàndard, i les variables qualitatives, com freqüències.

L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el paquet estadístic SPSS versió 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) fent servir proves paramètriques (ANOVA seguit de prova de Bonferroni i t de Student per comparació de variables contínues, aparellades quan calia; Chi2 per les variables qualitatives) o no paramètriques (U de Mann Withney i T de Wilcoxon), segons les seves condicions d'aplicació. La correlació entre variables es va mesurar per regressió lineal.

El valor de p de <0.05 bilateral es va considerar estadísticament significatiu.

5.2. ESTUDI 2: EFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ EXÒGENA DE TSH HUMANA RECOMBINANT SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS EN PACIENTS AMB CARCINOMA DIFERENCIAT DE TIROIDE.

5.2.1. Població de l'estudi

Es van incloure pacients amb CDT que van ser consecutivament reclutats al Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona i de l'Hospital Althaia de Manresa.

Seguint les directrius internacionals, tots els pacients van ser sotmesos a tiroïdectomia total seguida de tractament ablatiu amb iode radioactiu després de l'administració de TSH recombinant humana (rhTSH) (183).

Tots els pacients rebien tractament supressor de la TSH amb teràpia amb levotiroxina seguint les recomanacions de les guies actuals(184).

Criteris d'exclusió:

- Tenir menys de 18 anys o més de 70 anys d'edat,
- Condicions i factors de risc clínics amb efecte conegut sobre la inflamació o sobre la hemostàsia (com altres tipus de càncer, diabetis mellitus, insuficiència renal crònica o malalties inflamatòries),

- Antecedents de trombosi venosa o arterial o de trombofilia coneguda.
- Estar en tractament que podria influir en l'estat aterotrombòtic o arterioscleròtic, com ara corticosteroides, agents hipolipemians, anticoagulants o tractament antiagregant.
- Paràmetres bioquímics o hematològics anormals que no estiguin relacionats amb la funció tiroïdal.

5.2.2. Mètodes

a) Dades clíniques

Es van recollir les característiques clíniques següents:

- Edat
- Sexe
- BMI
- Hipertensió arterial
- Tabaquisme actiu

b) Administració de rhTSH

Seguint les indicacions d'administració de la rhTSH, els dos dies previs a la dispensació de iode radioactiu, els pacients van rebre una dosi intramuscular al gluti de rhTSH (Thyrogen®) 0,9mg durant dos dies consecutius (10).

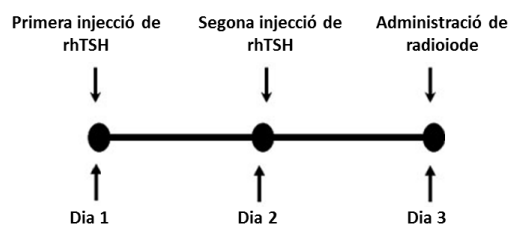


Figura 10. Esquema d'administració de la rhTSH.

c) Avaluació dels paràmetres bioquímics, hormonal i de l'hemostàsia

- Fase preanalítica.

L'extracció de sang es va realitzar sense venoclusió, al matí, en dejuni, amb l'individu assegut després d'un repòs mínim de 30 minuts.

L'obtenció de mostres va ser realitzada el dia 1 immediatament abans de l'administració de la primera dosi de rhTSH; el dia 3, 24 hores després de la segona dosi de rhTSH i immediatament abans de l'administració de la dosi de ^{131}I ; el dia 5, 48h després de l'administració de la dosi de ^{131}I ; i finalment als 10 dies des de la primera extracció.

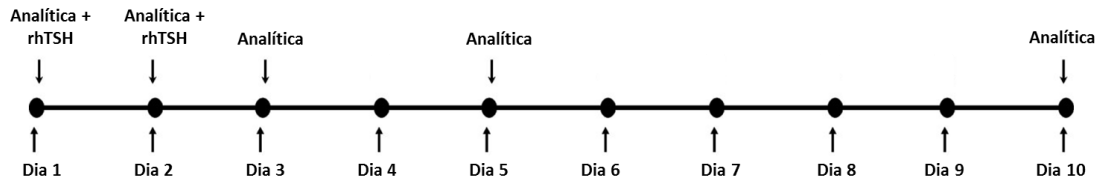


Figura 11. Esquema de l'administració de rhTSH i de les determinacions analítiques realitzades al llarg dels dies de l'estudi.

Es van obtenir les mostres de sang per punció venosa en tubs de polipropilè amb citrat sòdic al 3.8% (1/9, vol/vol) (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, Estats Units). Alhora, a la mateixa punció venosa, es van obtenir mostres en tubs sense additius (Becton Dickinson) per a fer els estudis analítics bioquímics i hormonal

Els tubs de sang obtinguda en citrat es van centrifugar immediatament (10 min, 20°C, 2.000 g) per a l'obtenció de plasma pobre en plaquetes per a realitzar-ne les determinacions d'hemostàsia. Una part del plasma obtingut en citrat es va sotmetre a una segona centrifugació (10 min, 4°C, 5.000 g) per a obtenir plasma lliure en plaquetes per les determinacions de micropartícules.

Les mostres en tubs sense additius, per a obtenir-ne sèrum, es van deixar coagular i es van centrifugar (15 minuts, 4°C, 3.000 g), per a realitzar els estudis bioquímics i hormonal.

Totes les mostres van ser fetes servir immediatament per a les determinacions analítiques i per a les que es van fer en diferit, el plasma obtingut es va congelar immediatament a -80°C. Totes les mostres van ser processades o congelades en un temps màxim de 4 h des de la seva obtenció. Les mostres processades en diferit no van ser sotmeses a cicles de congelació descongelació perquè es van conservar en alíquotes

PACIENTS I MÈTODES

de petit volum (100 µL). Les proves d'hemostàsia van ser realitzades sense conèixer el temps d'extracció de cada mostra. Els paràmetres es van determinar per duplicat i es van reavaluar quan va caldre per discrepància en el resultat. No van haver-hi mostres no determinades.

- Fase analítica.

Paràmetres bioquímics:

- Glucosa
- Creatinina
- Colesterol
- LDL Colesterol
- HDL Colesterol
- Triglicèrids
- ASAT
- LDH
- Proteïna C reactiva (PCR) ultrasensible
- Ferritina

La glucosa, la creatinina, el colesterol, els triglicèrids, la LDH i l'ASAT es van determinar per mètodes de rutina amb un autoanalitzador Shimadzu CL-7300 (Izasa, Barcelona, Espanya).

Les concentracions sèriques de PCR es van mesurar utilitzant una prova de PCR ultrasensible (N High Sensitivity CRP) en un BN-ProSpec nephelometer (Siemens) amb un coeficient de variació interassaig per sota de 3,7% i una sensibilitat de 0,175 mg/L, en una dilució de la mostra de 1:20.

La ferritina es va mesurar per turbidimetria (RAL, Barcelona, Espanya). Els coeficients de variació intraassaig van ser de 7,5%, 1,16% i 1,6%, i els coeficients de variació interassaig van ser 8,5%, 3,3% i 3,2% (interval de referència: 0-500 µg/L).

Paràmetres hormonals:

·TSH

·T4 lliure

·Tg sèrica

·aTPO

·aTg

Els valors de TSH i T4 lliure al sèrum es van mesurar fent servir un analitzador d'electroquimioluminescència (Modular I, Roche Diagnostics GmbH, Alemanya).

Les concentracions sèriques de Tg es van mesurar mitjançant un assaig quimioluminiscent immunomètric (Immulite 2000, Siemens), calibrat per l'estàndard CRM 457 amb una sensibilitat funcional de 0,9 ng/ml i un coeficient de variació

PACIENTS I MÈTODES

intraassaig de 4,8 i 6,8% en una concentració de dosi mitjana de 10 i 279 ng/ml, respectivament, amb un límit de detecció de 0,2 ng/mL de Tg sèrica.

Els aTPO i aTg i van ser detectats per ELISA (Orgentec Diagnostica, Mainz, Alemanya). Els valors superiors a 150 U/ml i 100 U/ml, respectivament, es van considerar positius.

Paràmetres de l'hemostàsia:

·Temps de protrombina

·APTT

·Fibrinogen

·F1+2

·TAT

·Dímer D

·Factor VII activat

·MP

El temps de protrombina i e l'APTT es van determinar amb un coagulòmetre automatitzat (Siemens, Marburg, Alemanya), utilitzant reactius estàndard (Siemens) i es van expressar com a proporcions (temps del pacient /temps promig de la població sana).

El fibrinogen es va mesurar per la tècnica de la Clauss (Siemens) (168).

Les concentracions plasmàtiques del marcador de la generació de trombina fragment 1 + 2 de la protrombina es va quantificar per ELISA (Enzygnost-F1+2, Siemens) (176).

Les concentracions del marcador de degradació de la fibrina estabilitzada, el dímer D, van ser mesurades mitjançant ELISA (Stago, Asnières, França).

Els complexos plasmina-antiplasmina, com a marcador d'activació de la fibrinòlisi en forma de generació de plasmina es van mesurar per ELISA de la forma prèviament descrita (185). En resum, es va adherir als pouets de la placa d'ELISA un anticòs dirigit enfront dels complexos plasmina-antiplasmina i es va utilitzar com a anticòs de mesura un anticòs de cabra marcat amb peroxidasa. El coeficient de variació intraassaig al laboratori és menor al 10%.

L'antigen del PAI-1 es va avaluar per ELISA (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, França) (175).

El factor VII activat es va mesurar per un assaig de coagulació (Stago) usant TF soluble recombinant (corresponent a la porció extracel·lular del TF natiu). El TF soluble recombinant pot produir la coagulació del plasma en presència de factor VII activat, de fosfolípids i de Ca^{+2} , però no pot activar el factor VII a factor VII activat (180,181). Les concentracions de factor VII activat es van expressar en mU/mL utilitzant un patró de calibratge enfront d'un estàndard secundari derivat del primer International Standard Factor VIIa Concentrate (89/688, NIBCS).

Les MP procoagulants es van mesurar per un assaig de captura en plaques d'ELISA basat en la propietat de l'annexina V (adherida a les plaques) d'unir-se a la fosfatidilserina de les MP circulants dipositades als pouets (Hyphen BioMed). La mesura es va basar en l'activació de la capacitat protrombinasa a la superfície de les MP adherides amb l'adició als pouets de factors bovins X activat i V activat i de protrombina humana. Després

PACIENTS I MÈTODES

d'incubar es va quantificar la trombina generada amb un substrat cromogènic específic per aquesta. Es va aturar la reacció amb àcid cítric al 2% abans de procedir a la seva lectura mesurant l'absorbància a 405 nm. Les MP procoagulants es van determinar per duplicat i es van expressar com a equivalents de nanomolar de fosfatidilserina (nM PS eq). El límit de detecció de la tècnica està establert en 0.05 nM PS eq. Al laboratori, el coeficient de variació intraassaig va ser del 5% i el interassaig del 8%.

El recompte de leucòcits i de plaquetes es va dur a terme mitjançant un comptador Coulter (Hialeah, FL, Estats Units).

d) Consentiment informat

Els estudis es van realitzar en conformitat amb la Declaració d'Hèlsinki i van ser aprovats pel Comitè local d'Investigació Ètica Humana de l'Hospital Germans Trias i Pujol i l'Hospital Althaia. Tots els participants van donar el seu consentiment informat per escrit abans de ser inclosos en l'estudi.

e) Anàlisi estadístic

L'anàlisi es va portar a terme a partir de l'exportació des d'una base de dades en Excel, amb un registre unívoc per pacient, que va ser anonimitzat en aquest procés.

Las variables contínues s'han expressat amb la mitjana \pm desviació estàndard i les variables qualitatives com a freqüències.

L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el paquet estadístic SPSS versió 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) fent servir proves paramètriques (ANOVA seguit de prova de Bonferroni i t de Student per comparació de variables contínues, aparellades quan calia; Chi2 per a les variables qualitatives) o no paramètriques (U de Mann Withney i T de Wilcoxon), segons les seves condicions d'aplicació. La correlació entre variables es va mesurar per regressió lineal.

El valor de p de <0.05 bilateral es va considerar estadísticament significatiu.

7- RESULTATS

7.1. RESULTATS ESTUDI 1: EFECTES DE L'ELEVACIÓ DE LA TSH PER HIPOTIROÏDISME SUBCLÍNIC I CLÍNIC SOBRE PARÀMETRES DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS.

Es van incloure 36 pacients amb hipotiroïdisme subclínic i 12 pacients amb hipotiroïdisme clínic. L'edat mitjana del pacients amb hipotiroïdisme subclínic era de 47.6 ± 18.9 anys i el 94.4% eren dones. L'edat mitjana dels pacients amb hipotiroïdisme clínic era de 45.3 ± 9.3 anys i el 83.3% eren dones.

El grup control de subjectes sans estava compost per 48 persones, amb una mitjana d'edat de 46.7 ± 12.2 anys, essent el 91.6% dones.

7.1.1. Dades clíniques

Les dades clíniques dels pacients i dels controls es recullen a la taula següent (Taula 2).

No es van trobar diferències significatives entre els grups.

RESULTATS

Taula 2: Dades clíniques dels controls i dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic i hipotiroïdisme clínic:

Paràmetre	Controls (n=48)	Hipotiroïdisme subclínic (n=36)	Hipotiroïdisme clínic (n=12)
Edat (anys)	46.7 ± 12.2	47.6 ± 18.9	45.3 ± 9.3
Sexe (%dones)	91.6	94.4	83.3
BMI (Kg/m²)	24.6 ± 4.3	24.8 ± 4.6	26.3 ± 5.2
Hipertensió arterial (%)	14.5	13.9	16.7
Tabaquisme actiu (%)	10.4	11.4	16.7

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

7.1.2. Paràmetres bioquímics

Els resultats dels paràmetres bioquímics avaluats als tres grups de l'estudi es recullen a la taula següent (Taula 3).

Taula 3: Resultats de les determinacions dels paràmetres bioquímics al moment basal del grup control, hipotiroïdisme subclínic i hipotiroïdisme clínic:

Paràmetre	Controls (n=48)	Hipotiroïdisme subclínic (n=36)	Hipotiroïdisme clínic (n=12)
Glucosa (mg/dL)	97 ± 11	95 ± 12	93 ± 14
Creatinina (mg/dL)	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2
Colesterol (mg/dL)	190 ± 21	195 ± 24	252 ± 61 ‡
Triglicèrids (mg/dL)	112 ± 61	98 ± 54	185 ± 83 ‡
ASAT (U/L)	22 ± 10	21 ± 11	24 ± 10
LDH (U/L)	159 ± 34	167 ± 45	161 ± 54

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

D'aquests paràmetres cal destacar que només es van trobar diferències en les xifres de colesterol i triglicèrids. Les concentracions de colesterol i de triglicèrids del grup de pacients amb hipotiroïdisme subclínic no van mostrar diferències significatives amb els controls. En canvi, als pacients amb hipotiroïdisme clínic les concentracions de colesterol i les de triglicèrids van ser significativament més elevades que en el grup control.

No es van observar diferències estadísticament significatives entre els controls, els pacients amb hipotiroïdisme subclínic i els pacients amb hipotiroïdisme clínic pel que fa

RESULTATS

a la resta de paràmetres bioquímics analitzats (glucosa, creatinina, colesterol total, triglicèrids, ASAT i LDH).

7.1.3. Paràmetres hormonals

Les dades dels paràmetres hormonals avaluats dels pacients i dels controls es recullen a la taula següent (Taula 4)

Taula 4: Resultats de les determinacions dels paràmetres hormonals al moment basal dels controls i dels pacients amb hipotiroidisme subclínic i clínic.

Paràmetre	Controls (n=48)	Hipotiroidisme subclínic (n=36)	Hipotiroidisme clínic (n=12)
TSH (mUI/L)	2.0 ± 0.9	8.8 ± 6.1	105.2 ± 105.4 ‡
T4 lliure (ng/dL)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.4	0.05 ± 0.03 ‡
aTPO o aTg positius (%)	0 %	55.6% †	33.3% †

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

En concordança amb els criteris d'inclusió emprats, es van observar diferències estadísticament significatives en les concentracions de TSH entre els grups, essent

normal en el grup control, mínimament elevada en el grup amb hipotiroïdisme subclínic i marcadament elevada en el grup d'hipotiroïdisme clínic.

De la mateixa manera, la concentració de T4 lliure va ser normal en els grup control i en el grup amb hipotiroïdisme subclínic, però estadísticament disminuïda en el grup amb hipotiroïdisme clínic.

El títol d'anticossos antitiroïdals va resultar positiu en els pacients amb malaltia tiroïdal i negatiu en els controls sans.

7.1.4. Paràmetres de l' hemostàsia

Els resultats dels paràmetres de l'hemostàsia avaluats als tres grups de l'estudi es recullen a la taula següent (Taula 5).

RESULTATS

Taula 5: Resultats de les determinacions dels paràmetres de l'hemostàsia al moment basal dels controls i dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic.

	Controls (n=48)	Hipotiroïdisme subclínic (n=36)	Hipotiroïdisme clínic (n=12)
Temps de protrombina	1.01 ± 0.15	0.98 ± 0.16	0.99 ± 0.20
APTT	1.02 ± 0.11	1.02 ± 0.10	1.04 ± 0.13
Factor VII (U/mL)	106.3 ± 20.2	97.6 ± 19.7	86.9 ± 25.9
Fibrinogen (g/L)	2.71 ± 0.84	2.67 ± 0.85	2.79 ± 0.91
Antitrombina (%)	101.2 ± 14.6	98.1 ± 11.4	90.1 ± 10.8
Plasminogen (%)	101.9 ± 17.7	105.5 ± 19.5	117.8 ± 16.3
Proteïna C (%)	99.8 ± 19.0	96.5 ± 21.8	104.1 ± 20.0
Proteïna S lliure (%)	102.3 ± 22.3	106.2 ± 22.0	98.7 ± 20.8
Dímer D (µg/mL)	0.23 ± 0.09	0.36 ± 0.12 †	0.48 ± 0.19 ‡
Antigen tPA (ng/mL)	5.16 ± 2.11	5.30 ± 2.18	5.09 ± 1.99
Activitat PAI-1 (U/mL)	17.7 ± 9.9	15.5 ± 8.7	14.3 ± 7.9
Antigen PAI-1 (ng/mL)	22.7 ± 12.8	28.8 ± 18.0	21.9 ± 14.3
Trombomodulina (ng/mL)	24.1 ± 10.5	26.3 ± 11.0	28.4 ± 10.1
F₁₊₂ (nmol/L)	0.71 ± 0.24	1.46 ± 0.76 ‡	1.28 ± 0.63 †
TAT (ng/mL)	3.1 ± 2.8	10.1 ± 9.7 ‡	9.2 ± 9.0 *
Factor VII activat (mU/mL)	56.3 ± 25.9	211.6 ± 47.9 ‡	184.7 ± 52.2 ‡
TFPI (ng/mL)	97.6 ± 30.4	81.0 ± 26.1	80.5 ± 24.4
TF induït (%TF)	8.5 ± 3.1	9.1 ± 4.2	9.4 ± 3.2
Activitat procoagulant induïda (mU/10⁵ cel)	7.4 ± 5.1	8.1 ± 4.9	8.3 ± 5.6
MP procoagulants (nM PS eq)	15.6 ± 8.1	29.2 ± 6.2 ‡	32.1 ± 7.2 ‡

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

Els pacients amb hipotiroïdisme subclínic presentaven marcadors suggestius d'un estat d'hipercoagulabilitat, determinat per un augment significatiu dels marcadors de la generació de trombina (F1+2 i complexos TAT) i del producte de degradació de la fibrina (dímer D) en comparació amb el grup control.

No es van observar als pacients amb hipotiroïdisme subclínic diferències significatives en les concentracions de fibrinogen, antitrombina, plasminogen, proteïna C i proteïna S lliure en comparació amb els controls. L'antigen de PAI-1, l'activitat de PAI-1 i l'activitat de t-PA no van ser estadísticament diferents als observats al grup control. La concentració de trombosmodulina, marcador de lesió endotelial, no va ser diferent de l'observada al grup control. La concentració de TFPI va ser lleugerament inferior en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic no tractats respecte als controls, però sense significació estadística.

Tot i que el factor VII:C es va mantenir dins dels límits de la normalitat als pacients amb hipotiroïdisme subclínic, es va observar en ells un marcat increment en el factor VII activat, però sense que això s'acompanyés d'un augment en la capacitat del plasma per induir l'expressió del TF en monòcits o d'un augment en l'activitat procoagulant induïda en les cèl·lules mononucleades.

Les MP procoagulants es van veure molt augmentades en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic, també marcador suggestiu d'un estat d'hipercoagulabilitat

El grup de pacients amb hipotiroïdisme clínic presentava també marcadors suggestius d'un estat d'hipercoagulabilitat. En ells es va observar un augment significatiu dels

RESULTATS

marcadors de generació de trombina (F1+2 i complexos TAT) i del dímer D en comparació amb el grup control.

No es van observar canvis estadísticament significatius als pacients amb hipotiroïdisme clínic en les concentracions de fibrinogen, antitrombina, plasminogen, proteïna C, proteïna S lliure, PAI-1 antigen, PAI-1 activitat, t-PA o trombomodulina en comparació amb el grup control. El TFPI i el factor VII:C van ser moderadament inferiors, però de manera no significativa en comparació amb el grup control.

La concentració del factor VII activat va ser més elevada en pacients amb hipotiroïdisme clínic respecte al grup control, però el TF induït en monòcits i l'activitat procoagulant induïda a les cèl·lules mononucleades no van augmentar en aquests pacients en comparació amb els controls.

Les MP procoagulants també es van observar molt augmentades en els pacients amb hipotiroïdisme clínic.

7.1.5. Avaluació dels paràmetres de l'hemostàsia després del tractament amb levotiroxina

a) Pacients amb hipotiroïdisme subclínic

Es van tractar amb levotiroxina sòdica un total de 18 pacients i es van reavaluar al cap de 6 mesos, després de confirmar que la concentració de TSH era normal. La dosi mitjana de tiroxina sòdica necessària per a assolir l'eutiroïdisme va ser de $1,4 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$.

El tractament substitutiu amb hormona tiroïdal durant sis mesos va induir canvis en els paràmetres d'hemostàsia avaluats. A la taula següent (Taula 6) es mostren els resultats obtinguts en aquests paràmetres abans i després del tractament als 18 pacients que es van tractar.

RESULTATS

Taula 6: Resultats de les determinacions analítiques abans i després del tractament amb levotiroxina sòdica en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic:

	Hipotiroïdisme subclínic Pretractament (n=18)	Hipotiroïdisme subclínic Posttractament (n=18)
Temps de protrombina	0.99 ± 0.17	1.01 ± 0.11
APTT	1.01 ± 0.10	1.01 ± 0.09
Factor VII (U/mL)	96.9 ± 19.4	96.4 ± 17.3
Fibrinogen (g/L)	2.65 ± 0.89	2.59 ± 1.01
Antitrombina (%)	99.1 ± 13.1	102.3 ± 12.4
Plasminogen (%)	106.7 ± 18.1	108.3 ± 13.5
Proteïna C (%)	96.0 ± 18.8	94.5 ± 12.6
Proteïna S lliure (%)	106.1 ± 22.4	104.1 ± 23.2
Dímer D (µg/mL)	0.36 ± 0.10	0.21 ± 0.12 **
Antigen tPA (ng/mL)	5.31 ± 2.16	5.33 ± 2.21
Activitat PAI-1 (U/mL)	15.6 ± 8.6	15.9 ± 7.8
Antigen PAI-1 (ng/mL)	26.7 ± 17.8	24.7 ± 16.6
Trombomodulina (ng/mL)	24.9 ± 12.0	21.2 ± 14.3
F₁₊₂ (nmol/L)	1.47 ± 0.71	0.96 ± 0.45 **
TAT (ng/mL)	10.0 ± 9.4	5.2 ± 4.9 **
Factor VII activat (mU/mL)	213.7 ± 46.3	70.5 ± 49.1 ††
TFPI (ng/mL)	81.0 ± 25.9	99.7 ± 20.9 **
TF induït (%TF)	9.1 ± 4.1	9.0 ± 3.4
Activitat procoagulant induïda (mU/10⁵ cel)	8.3 ± 4.7	8.6 ± 5.4
Micropartícules procoagulants (nM PS eq)	29.8 ± 6.5	16.3 ± 5.8 ††

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el resultat previ al tractament: **:p<0.05, ††:p<0.01.

Després d'aconseguir l'eutiroidisme, els marcadors de generació de trombina (F1 + 2 i TAT) i el dímer D es van normalitzar, i el factor VII activat va disminuir significativament respecte al valor basal. La concentracions de TFPI també van augmentar significativament després del tractament amb l'hormona tiroïdal, però sempre dins del rang de la normalitat.

Les MP procoagulants també es van normalitzar després del tractament amb levotiroxina, assolint valors similars als del grup control.

No es van detectar canvis significatius en els valors de temps de protrombina, APTT, Factor VII, fibrinogen, antitrombina, plasminogen, proteïna C, proteïna S lliure, antigen tPA, activitat PAI-1, antigen PAI-1, trombomodulina, TF induït ni activitat procoagulant induïda.

b) Pacients amb hipotiroïdisme clínic

Es van tractar amb levotiroxina sòdica tots els pacients amb hipotiroïdisme clínic (n=12). Després de 6 mesos de tractament amb levotiroxina sòdica, en tots els casos la concentració de TSH es va normalitzar.

La dosi mitjana de tiroxina sòdica necessària per a assolir l'eutiroidisme va ser de $1,65 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$.

El tractament substitutiu amb hormona tiroïdal durant sis mesos va induir canvis en els paràmetres d'hemostàsia avaluats. A la taula següent (Taula 7) es mostren els resultats obtinguts en aquests paràmetres abans i després del tractament als 12 pacients que es van tractar.

RESULTATS

Taula 7: Resultats de les determinacions analítiques abans i després del tractament amb levotiroxina sòdica en els pacients amb hipotiroïdisme clínic:

	Hipotiroïdisme clínic Pretractament n=12	Hipotiroïdisme clínic Posttractament n=12
Temps de protrombina	0.99 ± 0.20	1.02 ± 0.18
APTT	1.04 ± 0.13	1.01 ± 0.20
Factor VII (U/mL)	86.9 ± 25.9	100.3 ± 19.9
Fibrinogen (g/L)	2.79 ± 0.91	2.59 ± 0.86
Antitrombina (%)	90.1 ± 10.8	96.1 ± 12.9
Plasminogen (%)	117.8 ± 16.3	109.8 ± 20.2
Proteïna C (%)	104.1 ± 20.0	97.7 ± 23.3
Proteïna S lliure (%)	98.7 ± 20.8	100.7 ± 22.4
Dímer D (µg/mL)	0.48 ± 0.19	0.26 ± 0.15 **
Antigen tPA (ng/mL)	5.09 ± 1.99	5.10 ± 1.77
Activitat PAI-1 (U/mL)	14.3 ± 7.9	16.2 ± 7.9
Antigen PAI-1 (ng/mL)	21.9 ± 14.3	22.9 ± 11.3
Trombomodulina (ng/mL)	28.4 ± 10.1	23.7 ± 12.7
F₁₊₂ (nmol/L)	1.28 ± 0.63	0.84 ± 0.43 **
TAT (ng/mL)	9.2 ± 9.0	4.0 ± 3.1 **
Factor VII activat (mU/mL)	184.7 ± 52.2	70.3 ± 53.5 ††
TFPI (ng/mL)	80.5 ± 24.4	98.2 ± 25.1 **
TF induït (%TF)	9.4 ± 3.2	8.1 ± 3.6
Activitat procoagulant induïda (mU/10⁵ cel)	8.3 ± 5.6	8.6 ± 4.7
Micropartícules procoagulants (nM PS eq)	32.1 ± 7.2	15.7 ± 6.1 ††

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el resultat previ al tractament: **:p<0.05, ††:p<0.01.

Als sis mesos de tractament, el F1+2, el TAT i el dímer D es van normalitzar. Les concentracions plasmàtiques de factor VII activat es van reduir significativament respecte a les concentracions basals. Les concentracions de TFPI van augmentar significativament després de sis mesos de tractament des de valors que estaven al límit inferior de la normalitat fins a nivells similars als dels controls sans.

Les MP procoagulants també es van normalitzar després del tractament amb levotiroxina, assolint nivells similars als del grup control.

També es va objectivar una disminució significativa del colesterol sèric (2.17 ± 0.29 g/L, $p < 0.05$) i dels triglicèrids (1.33 ± 0.55 g/L, $p < 0.05$) respecte dels valors basals.

No es van detectar canvis significatius en els valors de temps de protrombina, APTT, Factor VII, fibrinogen, antitrombina, plasminogen, proteïna C, proteïna S lliure, antigen tPA, activitat PAI-1, antigen PAI-1, trombomodulina, TF induït ni activitat procoagulant induïda.

7.1.6. Avaluació global de l'hemostàsia als pacients amb hipotiroïdisme

A la taula següent (Taula 8) es mostren conjuntament els resultats obtinguts en els paràmetres de l'hemostàsia en els controls i en els pacients amb hipotiroïdisme clínic i subclínic:

Taula 8: Paràmetres de l'hemostàsia en controls i pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic abans del tractament i 6 mesos després.

	Controls	Hipotiroïdisme subclínic		Hipotiroïdisme clínic	
	(n=48)	Pretractament (n=36)	Posttractament (n=18)	Pretractament (n=12)	Posttractament (n=12)
Temps de protrombina	1.01 ± 0.15	0.98 ± 0.16	1.01 ± 0.11	0.99 ± 0.20	1.02 ± 0.18
Temps de tromboplastina parcial activat	1.02 ± 0.11	1.02 ± 0.10	1.01 ± 0.09	1.04 ± 0.13	1.01 ± 0.20
Factor VII (U/mL)	106.3 ± 20.2	97.6 ± 19.7	96.4 ± 17.3	86.9 ± 25.9	100.3 ± 19.9
Fibrinogen (g/L)	2.71 ± 0.84	2.67 ± 0.85	2.59 ± 1.01	2.79 ± 0.91	2.59 ± 0.86
Antitrombina (%)	101.2 ± 14.6	98.1 ± 11.4	102.3 ± 12.4	90.1 ± 10.8	96.1 ± 12.9
Plasminogen (%)	101.9 ± 17.7	105.5 ± 19.5	108.3 ± 13.5	117.8 ± 16.3	109.8 ± 20.2
Proteïna C (%)	99.8 ± 19.0	96.5 ± 21.8	94.5 ± 12.6	104.1 ± 20.0	97.7 ± 23.3
Proteïna S lliure (%)	102.3 ± 22.3	106.2 ± 22.0	104.1 ± 23.2	98.7 ± 20.8	100.7 ± 22.4
Dímer D (µg/mL)	0.23 ± 0.09	0.36 ± 0.12 †	0.21 ± 0.12**	0.48 ± 0.19 ‡	0.26 ± 0.15 **
Antigen tPA (ng/mL)	5.16 ± 2.11	5.30 ± 2.18	5.33 ± 2.21	5.09 ± 1.99	5.10 ± 1.77
Activitat PAI-1 (U/mL)	17.7 ± 9.9	15.5 ± 8.7	15.9 ± 7.8	14.3 ± 7.9	16.2 ± 7.9
Antigen PAI-1 (ng/mL)	22.7 ± 12.8	28.8 ± 18.0	24.7 ± 16.6	21.9 ± 14.3	22.9 ± 11.3

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

Diferències significatives amb el resultat previ al tractament: **:p<0.05, ††:p<0.01.

Taula 8 continuació: Paràmetres de l'hemostàsia en controls i pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic abans del tractament i 6 mesos després (continuació)

	Controls	Hipotiroïdisme subclínic		Hipotiroïdisme clínic	
	(n=48)	Pretractament (n=36)	Posttractament (n=18)	Pretractament (n=12)	Posttractament (n=12)
Trombomodulina (ng/mL)	24.1 ± 10.5	26.3 ± 11.0	21.2 ± 14.3	28.4 ± 10.1	23.7 ± 12.7
F₁₊₂ (nmol/L)	0.71 ± 0.24	1.46 ± 0.76 ‡	0.96 ± 0.45 **	1.28 ± 0.63 †	0.84 ± 0.43 **
TAT (ng/mL)	3.1 ± 2.8	10.1 ± 9.7 ‡	5.2 ± 4.9 **	9.2 ± 9.0 *	4.0 ± 3.1**
Factor VII activat (mU/mL)	56.3 ± 25.9	211.6 ± 47.9 ‡	70.5 ± 49.1 ††	184.7 ± 52.2 ‡	70.3 ± 53.5 ††
TFPI (ng/mL)	97.6 ± 30.4	81.0 ± 26.1	99.7 ± 20.9 **	80.5 ± 24.4	98.2 ± 25.1 **
TF induït (%TF)	8.5 ± 3.1	9.1 ± 4.2	9.0 ± 3.4	9.4 ± 3.2	8.1 ± 3.6
Activitat procoagulant induïda (mU/10⁵ cel)	7.4 ± 5.1	8.1 ± 4.9	8.6 ± 5.4	8.3 ± 5.6	8.6 ± 4.7
Micropartícules procoagulants (nM PS eq)	15.6 ± 8.1	29.2 ± 6.2 ‡	16.3 ± 5.8 ††	32.1 ± 7.2 ‡	15.7 ± 6.1 ††

Mitjana ± SD

Diferències significatives amb el grup control: *:p<0.05, †:p<0.01, ‡:p<0.001.

Diferències significatives amb el resultat previ al tractament: **:p<0.05, ††:p<0.01.

7.1.7. Correlacions entre variables de l'hemostàsia i TSH i T4 lliure

Es van avaluar les correlacions entre les variables de l'hemostàsia i les xifres de TSH i de T4. Per a aquesta anàlisi es van triar les variables que mostraven diferències significatives entre els pacients amb hipotiroïdisme i els subjectes normals

Els coeficients de correlació i els seus intervals de confiança es recullen a la taula següent (Taula 9).

Taula 9. Correlació entre les variables de l'hemostàsia avaluades i la TSH i la T4 lliure en el grup amb hipotiroïdisme subclínic i clínic de forma conjunta.

	TSH (mUI/L) r de Pearson (interval de confiança)	T4 lliure (ng/dL) r de Pearson (interval de confiança)
Dímer D (µg/mL)	-0.4911 (-0,2405 a -0,6803)	-0.3230 (-0,0427 a -0,5561)
F₁₊₂ (nmol/L)	0.7053 (0,8232 a 0,5290)	0.3841 (0,6004 a 0,1153)
TAT (ng/mL)	0.6651 (0,7983 a 0,4697)	0.3987 (0,6133 a 0,1291)
Factor VII activat (mU/mL)	0.7961 (0,8809 a 0,6616)	0.4945 (0,6827 a 0,2447)
Micropartícules procoagulants (nM PS eq)	0.8214 (0,8963 a 0,7008)	0.4851 (0,6760- 0,2330)

La correlació de totes les variables analitzades va ser molt més intensa amb les xifres de TSH que amb les de T4 lliure. Les tres variables que van mostrar una millor correlació amb la TSH van ser els fragment F1+2 de la protrombina, el factor VII activat i les MP procoagulants circulants.

7.2. RESULTATS ESTUDI 2: EFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ EXÒGENA DE TSH HUMANA RECOMBINANT SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA COAGULACIÓ I LES MICROPARTÍCULES PROCOAGULANTS EN PACIENTS AMB CARCINOMA DIFERENCIAT DE TIROIDE.

El grup d'estudi estava format per 57 pacients (46 dones). La dosi mitjana de tractament amb levotiroxina que rebien va ser de $2,17 \pm 0,43 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$. La mitjana d'edat dels pacients de l'estudi era de 46 ± 15 anys i el 73.7% eren dones.

Pel que fa a la histologia, 48 pacients presentaven un carcinoma papil·lar de tiroide i 9 pacients un carcinoma fol·licular.

Tots ells havien rebut tractament quirúrgic (tiroïdectomia total amb limfadenectomia segons indicació clínica).

7.2.1. Dades clíniques

A la taula següent (Taula 10) es mostren les dades clíniques de la població seleccionada:

Taula 10. Dades clíniques dels pacients sotmesos a rhTSH.

Paràmetre (n=57)	
Edat (anys)	46 ± 15
Sexe (dones) (%)	73.7
IMC (Kg/m²)	24.1 ± 4.2
Hipertensió arterial (%)	16.1%
Tabaquisme actiu (%)	5.3%

Mitjana ± desviació estàndard

7.2.2. Paràmetres hormonals, bioquímics i de l'hemostàsia abans de l'administració de rhTSH

Les concentracions de TSH sèrica basal van ser de 0,52 ± 2,47 mUI/L i les de T4 lliure basals van ser de 1,76 ± 0,39 ng/dL.

La concentració de tiroglobulina basal va ser de 0,15 ± 0,2 mg/dL.

Tots els pacients inclosos tenien unes concentracions basals de leucòcits, plaquetes, fibrinogen, PCR i ferritina normals.

Les determinacions analítiques en el moment inicial dels pacients abans de l'administració de rhTSH es mostren a la taula següent (Taula 11).

Taula 11: Resultats de les determinacions analítiques basals abans de l'administració de rhTSH:

Paràmetre (n=57)	Valor basal
TSH (mUI/L)	0.52 ± 2.47
T4 lliure (ng/dL)	1.76 ± 0.39
Leucòcits (x10⁹/L)	6900 ± 4217
Plaquetes (x10⁹/L)	231 ± 64
Fibrinogen (mg/dL)	418 ± 90
Proteïna C reactiva (mg/dL)	2.7 ± 2.5
Ferritina (µg/L)	55,49 ± 61,88
Antigen PAI-1 (ng/mL)	24,2 ± 11,2
Fragment 1+2 (nmol/L)	0,84 ± 0,24
Complexos plasmina-antiplasmina (µg/L)	288 ± 132
Dímer D (µg/mL)	0.25 ± 0.12
Factor VII activat (mU/mL)	53.5 ± 26.9
Micropartícules procoagulants (nM PS eq)	19.4 ± 5.6

Mitjana ± desviació estàndard

7.2.3. Paràmetres hormonals, bioquímics i de l'hemostàsia després de l'administració de rhTSH

La TSH va presentar una concentració màxima el dia 3 i va disminuir als valors inicials el dia 10 (Figura 12). La concentració de T4 lliure no va presentar canvis significatius al llarg de totes les determinacions realitzades durant l'estudi després de l'administració rhTSH.

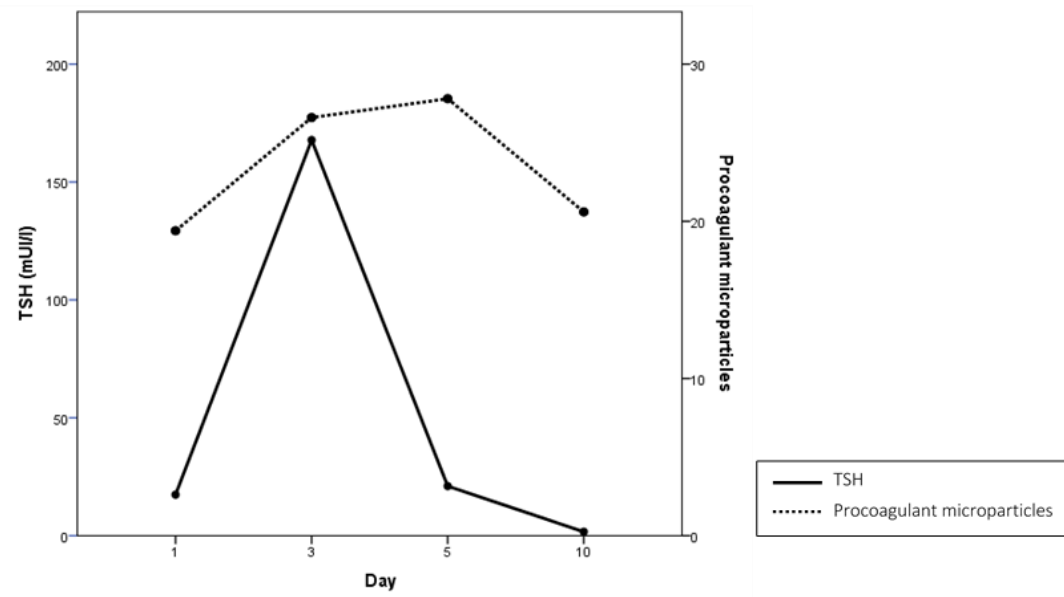
La concentració de tiroglobulina es va mantenir per sota de 0,5 mg/dL al llarg de totes les determinacions. Tots els pacients tenien proves de malaltia activa de CDT (persistència o recurrència) negatives (definit com a determinacions de tiroglobulina <0,5 mg/dL i imatges de rastreig corporal total negatives) (183).

Com es mostra a la Taula 12, les concentracions dels paràmetres inflamatoris com el nombre de leucòcits, el recompte de plaquetes, el fibrinogen i la PCR i no van mostrar canvis significatius al llarg del seguiment.

Pel que fa als paràmetres de l'hemostàsia, no es van trobar diferències significatives en les concentracions del F1+2, del complex plasmina-antiplasmina, en les avaluacions realitzades als dies 3, 5 i 10 després de l'administració de rhTSH.

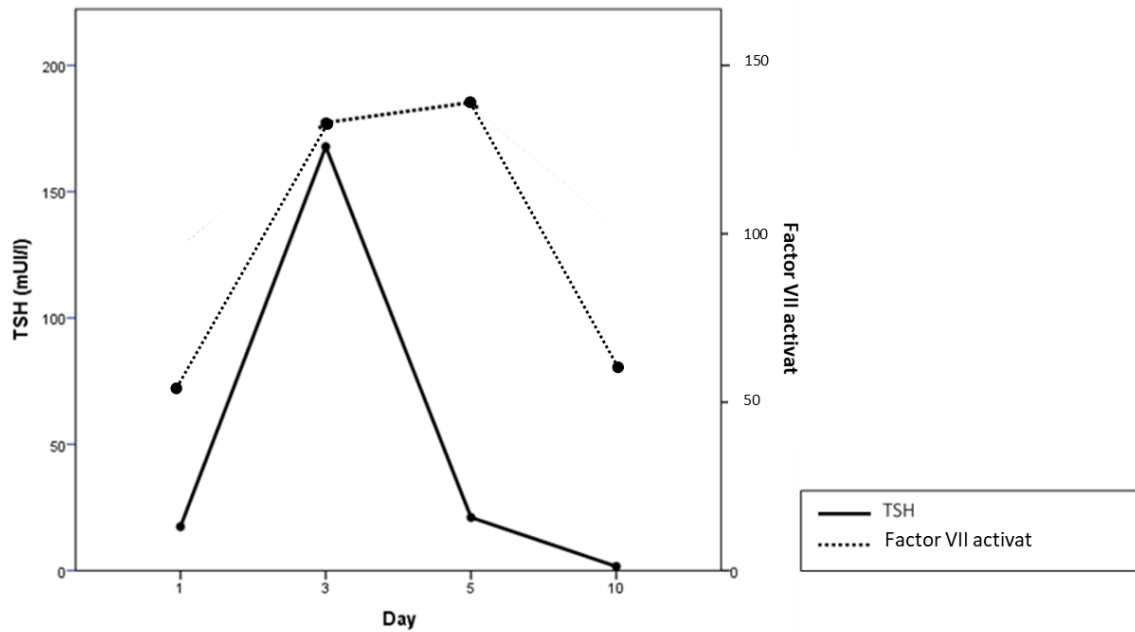
La concentració de MP procoagulants va presentar un augment significatiu amb una concentració màxima el dia 5 (basal: $19,4 \pm 5,6$, dia 3: $26,6 \pm 6,1$, dia 5: $27,8 \pm 7,3$, dia 10: $20,6 \pm 4,4$; $p < 0,001$) (Figura 12). Així mateix, es va veure una elevació estadísticament significativa del factor VII activat els dies 3 i 5 després de l'administració de rhTSH (figura 13).

Figura 12. Evolució de la concentració de la TSH i les MP procoagulants des d'abans de l'administració de la rhTSH i durant els 10 dies de seguiment posteriors a l'administració de rhTSH.



RESULTATS

Figura 13. Evolució de la concentració de la TSH i del Factor VII activat des d'abans de l'administració de la rhTSH i durant els 10 dies de seguiment posteriors a l'administració de rhTSH.



La taula següent (Taula 12) mostra les concentracions basals i als dies 3, 5 i 10 després de l'administració de rhTSH dels diferents paràmetres avaluats.

Taula 12: Resultats de les determinacions analítiques després de l'administració de rhTSH:

	Basal (n=57)	Dia 3 (n=57)	Dia 5 (n=57)	Dia 10 (n=57)	P
TSH (mUI/L)	0.52 ± 2.47	167.78 ± 62.11	21.05 ± 14.15	1.66 ± 6.27	<0.001
T4 lliure (ng/dL)	1.76 ± 0.39	1.79 ± 0.40	1.81 ± 0.41	1.78 ± 0.39	NS
Leucòcits (x10⁹/L)	6900 ± 4217	6696 ± 4635	7133 ± 4872	6630 ± 4257	NS
Plaquetes (x10⁹/L)	231 ± 64	235 ± 65	241 ± 72	237 ± 67	NS
Fibrinogen (mg/dL)	418 ± 90	410 ± 90	407 ± 88	424 ± 91	NS
Proteïna C reactiva (mg/dL)	2.7 ± 2.5	2.3 ± 2.0	2.4 ± 2.5	3.8 ± 5.4	NS
Ferritina (µg/L)	55.49 ± 61.88	56.12 ± 63,48	49.95 ± 53.1	48.16 ± 58.37	NS
Antigen PAI-1 (ng/mL)	24.2 ± 11.2	29.9 ± 13.1	27.8 ± 14.5	23.2 ± 15.3	NS
F1+2 (nmol/L)	0.84 ± 0.24	0.87 ± 0.26	0.86 ± 0.31	0.86 ± 0.27	NS
Complexos plasmina-antiplasmina (µg/L)	288 ± 132	295 ± 136	280 ± 147	299 ± 129	NS
Dímer D (µg/mL)	0.25 ± 0.12	0.26 ± 0.14	0.24 ± 0.13	0.26 ± 0.15	NS
Factor VII activat (mU/mL)	53.5 ± 26.9	115.6 ± 59.1	131.0 ± 56.2	65.3 ± 39.4	<0.001
MP procoagulant (nM PS eq)	19.4 ± 5.6	26.6 ± 6.1	27.8 ± 7.3	20.6 ± 4.4	<0.001

Mitjana ± desviació estàndard

8- DISCUSSIÓ

En els dos estudis que hem realitzat es demostra que l'elevació de la TSH, ja sigui en una situació d'hipotiroïdisme subclínic o clínic, o per administració exògena de rhTSH, s'associa a una activació de la coagulació, augmentant els valors dels marcadors d'hipercoagulabilitat, en especial els de generació de trombina in vivo (el F1+2 i els complexos TAT), el factor VII activat i les MP procoagulants. Això revela l'aparició d'un estat procoagulant i protrombòtic en els pacients amb TSH elevada.

8.1. HIPOTIROIDISME I ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ

L'hemostàsia s'ha estudiat en l'hipotiroïdisme i s'han descrit alteracions en la coagulació dels pacients amb hipotiroïdisme, alhora que s'han proposat un gran nombre de possibles causes per justificar els trastorns de la coagulació identificats. De tota manera cal dir que, en els diversos articles publicats, hi ha discrepàncies pel que fa a si l'hipotiroïdisme està associat a una situació d'augment, o de disminució tant de la coagulació com de la fibrinòlisis, donant o no lloc a un estat d'hipercoagulabilitat (161,186).

Aquestes discrepàncies es poden deure en bona mesura als diferents paràmetres considerats als treballs realitzats, paràmetres que han estat la majoria de vegades poc estructurats, així com a diferències en la metodologia analítica, del disseny de l'estudi i dels subgrups de pacients amb hipotiroïdisme que s'han reclutat. De tota manera les dades clíniques suggereixen més una tendència protrombòtica per la freqüent

DISCUSSIÓ

associació de l'hipotiroïdisme amb patologia vascular arterioescleròtica i de malaltia tromboembòlica per sobre de l'augment del sagnat que només es dona en alguns pacients. En aquest sentit, els resultats obtinguts en el nostre primer estudi en pacients amb hipotiroïdisme clínic i subclínic recolzen que aquestes situacions clíniques s'associen a un estat procoagulant, la transcendència del qual està per determinar.

En el cas dels pacients amb hipotiroïdisme clínic, pel que fa a una possible tendència a l'hemorràgia, diversos estudis han demostrat que el fVW pot estar disminuït, però altres autors han trobat en pacients amb la mateixa malaltia valors normals del mateix paràmetre (136,152,187). En suport a una teòrica hipocoagulabilitat en pacients amb hipotiroïdisme clínic també s'han trobat disminucions en els factors de la coagulació, com ara els factors VII, VIII, IX, XI i XII (136,145,148,188), o augment del tPA (135). Els mecanismes pels que es poden veure concentracions valors reduïdes dels factors de coagulació en pacients amb hipotiroïdisme clínic no són ben coneguts (6). S'ha suggerit que es podrien deure a la disminució generalitzada de la síntesi de proteïnes o a una disminució del seu metabolisme, pròpies de l'hipotiroïdisme (6,178). Els nostres resultats no donen suport a una situació d'hipocoagulabilitat en l'hipotiroïdisme clínic. No hem observat cap disminució de cap dels components procoagulants de l'hemostàsia als pacients en aquesta situació clínica abans del tractament, ni canvis rellevants després del tractament substitutiu amb levotiroxina sòdica.

Pel que fa a una possible tendència a l'hipercoagulabilitat, estudis realitzats també en pacients amb hipotiroïdisme clínic han objectivat canvis que suggereixen un estat protrombòtic amb alteracions de la coagulació i la fibrinòlisis. Les investigacions realitzades han detectat augments del fibrinogen, del dímer D, del TAFI, del PAI-1, del

factor VII, del factor VIII, del factor IX i del fVW, com paràmetres principals, tots ells d'acció procoagulant (130,132,154–159,189). Hi ha evidència d'una reducció en l'aclariment al plasma dels factors de la coagulació II, VII, IX i X en els pacients amb hipotiroïdisme clínic (190), tant en estudis experimentals en rates (191) com en éssers humans (178). La reducció de l'aclariment dels factors de coagulació pot causar que en els pacients amb hipotiroïdisme clínic hi hagi un acúmulo de dels mateixos augmentant la seva concentració en plasma, exposant-los a ser activats amb més facilitat i intensitat el que podria provocar un estat d'hipercoagulabilitat. Altres autors proposen que en els pacients amb hipotiroïdisme clínic els factors de coagulació poden estar augmentats degut a la baixa concentració de triiodotironina, exercint un efecte directe sobre la transcripció genètica dels factors de coagulació i augmentant-ne les seves concentracions, situant-los en una situació protrombòtica (192).

Als nostres estudis hem observat als pacients amb hipotiroïdisme clínic un increment dels valors de marcadors d'hipercoagulabilitat com el F1+2 i els complexos TAT, tots dos com mesura de la generació de trombina in vivo; del factor VII activat, com efector d'un increment de la coagulació; del dímer D, com marcador de la formació, estabilització i posterior destrucció de la fibrina; i de les MP procoagulants, partícules relacionades amb l'activació de la coagulació. Tot això suporta la visió d'aquest pacients amb hipotiroïdisme clínic com a portadors d'alteracions pròpies d'un estat protrombòtic.

Pel que fa als trastorns de la coagulació en el cas dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic els resultats, de la mateixa manera que a l'hipotiroïdisme clínic, han estat de vegades contradictoris a la literatura. La majoria dels estudis mostren un estat

DISCUSSIÓ

d'hipercoagulabilitat, però identificat també de forma poc sistematitzada tal i com passa a l'hipotiroïdisme clínic.

Existeix poca evidència científica per suportar la hipòtesi d'un estat d'hipocoagulabilitat que pugui ser responsable de risc hemorràgic en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic. Gullu et al. (136) van observar discrets canvis amb disminució en els valors de factor VIII i de factor von Willebrand, que eren reversibles quan se subministrava tractament amb levotiroxina.

L'evidència és més extensa en demostrar un estat d'hipercoagulabilitat en el grup de pacients amb hipotiroïdisme subclínic. Muller et al (131) van descriure un estat d'hipercoagulabilitat en pacients amb hipotiroïdisme subclínic objectivant un augment de la ratio del factor VII coagulant/factor VII antigen, cosa que podria reflectir la presència de quantitats més grans de factor VII activat. El factor VII activat, juntament amb el TF, és un dels factors principals en l'inici fisiològic de la coagulació (24) alhora que activa la coagulació a través de les MP (139). També el grup de Guldiken (133) van descriure que la capacitat fibrinolítica estava disminuïda als pacients amb hipotiroïdisme subclínic, suggerint un estat protrombòtic, i Akinci et al. (132) van objectivar en aquests pacients una elevació de l'antigen del TAFI, el que causaria hipofibrinolisis i per tant seria procoagulant. Lupoli et al. (135) van demostrar que els pacients amb hipotiroïdisme subclínic presentaven uns valors més elevats de factor VII, de PAI-1 i del tPA, i Cantürk et al. (134) van observar augment del fibrinogen, del PAI-1 i del factor VII i una disminució de l'antitrombina en un grup de dones amb hipotiroïdisme subclínic.

Les dades dels nostres estudis donen suport a un estat d'hipercoagulabilitat biològica en pacients amb hipotiroïdisme subclínic com ja passava a l'hipotiroïdisme clínic, amb augment del F1+2, que és un fragment de la trombina generada i per tant marcador de la quantitat de fibrina creada per formar el coàgul; dels complexos TAT, usats també com a marcadors de la quantitat de trombina produïda i, en conseqüència, de l'activació de la coagulació; del factor VII activat, factor clau en l'inici de la coagulació; del dímer D, com marcador de la formació, estabilització i posterior destrucció de la fibrina; i de les MP procoagulants, partícules relacionades amb l'activació de la coagulació, deixant a aquests pacients en un estat protrombòtic.

Que coneguem, no existeixen estudis publicats fins a dia d'avui sobre la possible relació entre el F1+2 o els complexos TAT i l'hipotiroïdisme, ja sigui clínic o subclínic, així com de bastants dels altres paràmetres de l'hemostàsia que hem estudiat. Altres estudis publicats objectiven, a l'igual que nosaltres, un augment del dímer D o del factor VII en pacients amb hipotiroïdisme tant clínic com subclínic (130,131,134,135,147).

En referència a l'augment del factor VII activat elevat que hem objectivat mencionar que podria ser, conjuntament amb les altres alteracions de l'hemostàsia que s'han descrit a l'hipotiroïdisme en els components de la cascada de coagulació, el causant d'aquest augment en la generació de trombina in vivo descrit als nostres estudis (elevació dels complexos TAT, del F 1+2 i del dímer D). El factor VII activat juga un paper important en estats d'hipercoagulabilitat, sent un dels factors principals implicats en l'inici de la cascada de la coagulació i en la formació de trombina (193). La seva presència en plasma pot indicar una major activació de la coagulació in vivo (14,15). Com que el factor VII activat no té un inhibidor fisiològic eficient i la seva semivida és llarga, els pacients amb

DISCUSSIÓ

hipotiroïdisme podrien mantenir a través del factor VII activat la formació de trombina que condueix a l'estat d'hipercoagulabilitat. Aquests valors elevats de factor VII activat resulten congruents amb les troballes als nostres estudis referents a l'augment de la generació de trombina in vivo, avaluada per els marcadors F1+2 i complexes TAT, i de la formació de fibrina, mesurada amb el dímer D. Destacar que Muller et al. (131) van trobar resultats congruents amb els nostres d'elevació del factor VII activat en un estudi realitzat en un grup de 42 dones amb hipotiroïdisme subclínic.

Respecte a l'augment de producció de MP observat a ambdós grups de malalts del nostre estudi és un fet que recolza un estat protrombòtic en aquests pacients. Aquestes MP, sense nucli ni capacitat de síntesi, i que s'han alliberat per gemmació exofítica de la membrana plasmàtica de diferents tipus cel·lulars (44), participen en l'homeòstasi vascular (41). Les MP contenen a la seva membrana externa proteïnes de les cèl·lules on s'han originat i això els confereix una capacitat procoagulant ja sigui unint-se als components de les vies de la coagulació (44,51), o iniciant elles mateixes i de forma independent la coagulació intravascular (52). D'aquesta manera l'augment de MP observat al nostre estudi pot activar les vies de la coagulació i donar aquest augment de la generació de trombina in vivo que hem objectivat.

Una de les conseqüències més transcendents dels estats d'hipercogulabilitat és la seva associació amb la malaltia tromboembòlica i, per tant, l'augment del risc cardiovascular. En aquest sentit, el factor VII activat s'ha trobat elevat en pacients amb malaltia coronària (194), on se li ha atribuït la promoció de la hiperplàsia de la intima arterial

(195), el que podria contribuir a l'elevada incidència d'aterosclerosi i de malaltia cardiovascular a l'hipotiroïdisme (196). És destacable que els pacients del nostre estudi presentaven elevació del factor VII activat, cosa que els conferiria un augment en general del risc cardiovascular.

Les MP també han estat relacionades amb augment de risc cardiovascular. S'ha descrit que quan existeix arteriosclerosi hi ha una producció més elevada de MP (81,82), i que aquestes MP tenen efectes funcionals sobre la malaltia aterotrombòtica (83), promovent el reclutament de cèl·lules inflamatòries, induint l'adhesió cel·lular i plaquetària a través de l'augment de citocines (84), afavorint el reclutament de plaquetes (83) i la infiltració de monòcits a les plaques d'ateroma (85), i donant com a resultat final la formació de trombes. Per altra banda, a l'aterosclerosi es sol associar una elevada força de cisallament, cosa que pot iniciar l'agregació plaquetària i, alhora, la aparició de MP procoagulants (93). S'ha objectivat una gran quantitat de MP procoagulants dins de les plaques d'ateroma i aquestes MP confinades dins les plaques d'arteriosclerosi tenen un potencial trombogènic encara major que les MP circulants (90). Aquestes MP que podríem anomenar intraplaca augmenten el reclutament de cèl·lules inflamatòries a la mateixa y això contribueix a la seva inestabilitat potenciant la carga trombogènica i el creixement de la placa d'arteriosclerosi (92). Fins i tot s'ha descrit que les MP podrien predir infarts de miocardi fins a tres anys abans de que es produeixin (103). Amb tota l'evidència que tenim les MP podrien ser considerades biomarcadors per al diagnòstic, valoració de l'activitat, predicció de la resposta al tractament i pronòstic de la malaltia cardiovascular aterotrombòtica (71).

DISCUSSIÓ

Diversos estudis han demostrat que l'hipotiroïdisme augmenta el risc cardiovascular i de malaltia coronària (115–117). En el cas dels pacients amb hipotiroïdisme clínic s'ha descrit que aquest augment està en relació amb canvis en la contractilitat cardíaca, en el consum d'oxigen del miocardi, en la despesa cardíaca, en la pressió arterial i en la resistència vascular sistèmica (197). Per altra banda, s'ha observat que pot haver-hi un augment de la resistència vascular perifèrica, disminució de l'inotropisme, resistència a la insulina, inflamació, aterosclerosi i reducció de la freqüència cardíaca així com disminució de la contracció i la relaxació del miocardi que s'observa en els pacients amb hipotiroïdisme clínic acaba produint insuficiència cardíaca (128)) (198). La malaltia coronària arterial que pot coexistir amb l'hipotiroïdisme pot ser preexistent i no simptomàtica, però es pot veure agreujada en el moment en que es presenta la disfunció tiroïdal (128).

En el cas de l'hipotiroïdisme subclínic l'augment de risc cardiovascular no està tan ben establert. S'ha descrit en aquests pacients amb uns efectes més evidents quan la TSH és superior a 10mU/L (120). Variis estudis han demostrat que l'hipotiroïdisme subclínic pot provocar insuficiència cardíaca (115–117) i major progressió de la disfunció ventricular en aquells que ja presenten la malaltia cardíaca quan es comparen amb un grup de pacients amb funció tiroïdal normal (118,119). La disfunció ventricular és predominantment diastòlica (199) i es manté significativa quan ajustem per altres factors de risc cardiovasculars (116,119,200). L'hipotiroïdisme subclínic també s'ha associat a un major risc d'episodis de malaltia coronària fatals i no fatals, d'aterosclerosi i de malaltia arterial coronària quan es comparen amb pacients amb funció tiroïdal normal, amb un augment de la mortalitat cardiovascular en els pacients amb

hipotiroïdisme subclínic. Aquest risc no s'ha trobat significativament diferent quan s'ajusta per edat, sexe, altres factors de risc o malaltia cardiovascular pre-existent, i també ha estat més evident en pacients amb valors de TSH ≥ 10 mU/L (120,201–204). S'ha mostrat que els valors elevats de TSH, però no els valors d'hormones tiroïdals que romanen normals en pacients amb hipotiroïdisme subclínic, es correlacionen amb la mida del trombe coronari a pacients amb infart de miocardi (205) i els confereix un augment del risc de patir trombosi venosa (206). Tot i aquestes descripcions, quan la TSH és inferior a 10 mU/L no existeixen fins el moment, evidències clares de que siguin pacients amb un risc cardiovascular incrementat.

En aquest sentit, els nostres estudis aporten noves dades al respecte. L'augment del factor VII activat i de les MP procoagulants que hem objectivat en els nostres pacients també podria contribuir a explicar aquest augment de risc cardiovascular que presenten els pacients amb hipotiroïdisme.

Els mecanismes implicats en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular en els pacients amb hipotiroïdisme no estan del tot clars. En el cas de l'hipotiroïdisme subclínic, es proposa que la dislipèmia i l'elevació de la tensió arterial present en aquest grup de malalts (121) (122), l'augment del gruix de la íntima-mitja carotídia (121), l'estrès oxidatiu (207), la disfunció endotelial a través de l'afectació de la producció d'òxid nítric facilitant l'augment de la degradació dels vasodepressors (208) o la disfunció vascular amb augment de la rigidesa vascular (208) poden estar en l'origen d'aquest augment de risc i mortalitat cardiovascular i de l'augment dels episodis d'insuficiència cardíaca. També com en el nostre cas, s'ha involucrat en algun estudi un estat d'hipercoagulabilitat (124). Altres autors proposen també l'efecte de l'elevació de les MP apoptòtiques que

DISCUSSIÓ

s'observa en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic, MP que s'han trobat elevades en processos de reparació endotelial, dany tissular i remodelació vascular (120,127).

En el cas de l'hipotiroïdisme clínic aquest augment de risc cardiovascular s'explica bàsicament per la disminució de les hormones tiroïdals perifèriques (T3 i T4) (128). Les hormones tiroïdals tenen un efecte no-genòmic extranuclear tant sobre el miòcit cardíac com sobre la vascularització sistèmica (197). Quan la T3 i T4 disminueixen s'observa un clar augment del colesterol (129), hipertensió arterial diastòlica, resistència a la insulina i inflamació (128), a part de l'efecte directe de la T3 i T4 sobre el seu receptor al miòcit cardíac i la vascularització perifèrica que també pot tenir un efecte directe sobre la malaltia cardiovascular en aquest grup de malalts (128).

En vista dels resultats del nostre estudi podríem proposar que l'elevació del factor VII activat i de les MP procoagulants en pacients amb hipotiroïdisme no només els confereix un estat procoagulant si no que podria contribuir a aquest augment de malaltia cardiovascular objectivat en aquest conjunt de pacients.

8.2. EFECTES DEL TRACTAMENT DE L'HIPOTIROIDISME AMB LEVOTIROXINA

En els estudis d'intervenció realitzats el tractament amb hormones tiroïdals normalitza en la majoria d'ells els paràmetres de la coagulació identificats com alterats abans del mateix (132,135,136,150,151). En el nostre treball hem observat que després del tractament amb levotiroxina sòdica els paràmetres de l'hemostàsia que estaven alterats

tant en els pacients amb hipotiroïdisme clínic com a aquells amb hipotiroïdisme subclínic es normalitzaven. D'aquesta manera, el factor VII activat, els F1+2, els complexos TAT, el dímer D i les MP procoagulants es normalitzen als sis mesos de tractament als pacients amb hipotiroïdisme clínic o subclínic. Aquesta normalització pot ser explicada per l'efecte de la restitució a límits fisiològics de les hormones tiroïdals o de la TSH plasmàtiques en els pacients tractats en el cas dels pacients amb hipotiroïdisme clínic, i per l'efecte de la normalització de la TSH en el cas dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic ja que aquests no han vist modificats les seves concentracions de T3 i T4 lliures. La bona correlació observada al nostre primer estudi entre la TSH i els marcadors d'hipercoagulabilitat avaluats als pacients amb hipotiroïdisme suggereix que hi ha un efecte predominant de l'elevació de la TSH per sobre de l'efecte propi de la disminució de les hormones tiroïdals (considerant els valors de T4 lliure a aquests pacients), el qual té una correlació menys intensa.

La normalització dels paràmetres d'hipercoagulabilitat amb el tractament substitutiu en els pacients amb hipotiroïdisme pot ser un argument a favor del tractament amb levotiroxina sòdica en aquells pacients amb hipotiroïdisme subclínic on el tractament pot estar en controvèrsia (1). En aquesta línia, els nostres resultats ens permeten argumentar que en aquests pacients el tractament els podria ajudar en la prevenció del risc cardiovascular inherent a la malaltia tiroïdal que pateixen.

8.3. rhTSH I ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ

Al segon estudi que hem realitzat hem observat una relació entre l'administració de rhTSH i una elevació de les MP procoagulants circulants i del factor VII activat. Recordem que l'rhTSH és una hormona sintètica administrada en pacients amb càncer de tiroide que seran sotmesos a tractament amb radioiode o que seran examinats mitjançant proves d'imatge o en un rastreig corporal total amb radioiode després de ser intervinguts per carcinoma diferenciat de tiroide. Aquest tractament eleva la concentració de TSH però mantenint les de T4 lliure dins del rang de la normalitat i sense variacions al llarg dels dies (7). En el nostre estudi, efectivament, la T4 lliure es va mantenir sense modificacions al llarg dels dies i únicament va variar la TSH, que va augmentar fins a un pic màxim al dia 5 i va tornar a la normalitat al dia 10. Per aquest motiu es va poder avaluar l'efecte directe de la TSH sobre els paràmetres de coagulació i les MP procoagulants, independentment de les concentracions de les hormones tiroïdals.

Per aquest segon estudi vam triar com a variables de l'hemostàsia aquelles que havien sortit significatives a l'estudi 1. Els complexos TAT no es van incloure ja que vam considerar-los redundants amb el fragment F1+2, al mirar el mateix fenomen de la coagulació, i vam triar d'entre ells el de major significació que al primer treball va ser el F1+2.

Els resultats d'aquest segon estudi suggereixen que l'elevació de la concentració de TSH, per si mateixa i independentment dels valors de les hormones perifèriques (T3 i T4), pot

estar relacionada amb l'augment de la concentració de factor VII activat i de MP procoagulants. A l'igual que al nostre primer estudi aquests resultats concorden en assenyalar una activació de la coagulació en pacients que presenten elevació de la TSH.

Abans del nostre només hi ha un estudi dissenyat per avaluar la possible relació entre l'administració de rhTSH i les MP (167) al qual, a l'igual del que hem objectivat nosaltres, Burger et al. van veure un augment de les MP procoagulants en pacients sotmesos a l'administració de rhTSH, mostrant el dia 3 un augment de 1.5 vegades el nivell basal, i el dia 5 un augment de 1.9 vegades. Nosaltres hem vist un augment de 1.4 vegades el nivell basal als 3 dies, un augment de 1.5 vegades al dia 5 i la normalització del número de MP al dia 10 després de l'administració de rhTSH. L'augment de MP procoagulants als pacients del nostre estudi, i també al de Burger et al. (167), podrien indicar una major disfunció endotelial i activació de les cèl·lules de la sang i, per tant, un major risc cardiovascular i tendència a la trombosi, situació que ja han proposat altres autors per justificar aquest augment de malaltia vascular endotel·lial (120,127).

Pocs autors abans que nosaltres han estudiat la relació entre la rhTSH i altres possibles alteracions de la coagulació. En aquest sentit, Desideri et al. (166) van observar l'elevació de molècules que indiquen l'activació de les cèl·lules endotelials i de les plaquetes després de l'administració de rhTSH, com ara les concentracions plasmàtiques de la molècula d'adhesió intercel·lular-1 soluble, de la E-selectina soluble, de la P-selectina soluble, del CD40 lligant soluble i de les de 8-iso-prostaglandina F2a plasmàtica. Tot això suggereix que la rhTSH pot tenir un efecte proaterogenic través de l'activació de les cèl·lules endotelials vasculars i de les plaquetes i d'altres cèl·lules sanguínies. Aquests resultats concorden amb les nostres troballes, on els pacients es troben en una situació

DISCUSSIÓ

d'augment molt rellevant de marcadors d'estat procoagulant i protrombòtic després de l'administració de rhTSH.

Al contrari, Yango et al. (152) no van trobar modificacions dels paràmetres que van estudiar (plaquetes, fibrinogen, temps de trombina, temps de protrombina, temps de tromboplastina parcial activat, factor VIII, factor von Willebrand *col·lagen binding activity* i factor von Willebrand antigen) en 30 pacients exposats a rhTSH, i, per la seva banda, Debeij et al. (157) tampoc van trobar cap canvi en les concentracions del factor II, VIII o IX, ni en les concentracions d'antitrombina, proteïna S, fibrinogen, complexos TAT ni F1+2 1en un grup de 17 pacients amb carcinoma de tiroide curat exposats a rhTSH.

Les nostres dades objectiven que l'administració aguda de rhTSH provoca una elevació del facto VII activat. Aquest factor VII activat és un marcador nou que, fins a dia d'avui, no ha estat estudiat per altres autors en pacients sotmesos a rhTSH. Els altres factors implicats en la coagulació analitzats al noste estudi no mostren canvis després de l'administració de rhTSH, resultats que són concordants amb els estudis realitzats per Debeij (157) i Yango (152). En aquest aspecte era d'esperar que si trobavem més factor VII activat també hauríem d'haver objectivat més F1+2, però no ha estat el cas. Aquesta resposta inesperada es podria dure a que l'efecte del fàrmac sigui massa curt i en els pocs dies en que hi ha exposició a la rhTSH no hi hagi temps suficient per objectivar elevacions en el F1+2. De tota manera, en estudis que han avaluat algun possible desencadenat per l'activació del sistema de coagulació s'han observat canvis en els marcadors de hipercoagulabilitat, amb augment o disminució, entre 5 i 8 hores després del desencadenant (209,210), pel que aquesta justificació no seria massa plausible. Una

altra explicació a donar per justificar aquesta situació seria que l'elevació aguda i breu de la TSH que fa augmentar el factor VII activat pot ser contrarestada pel inhibidors propis de la coagulació pel que fa a la generació de trombina. En aquest sentit podria existir una acció important inhibidora del sistema proteïna C – proteïna S que impediria la generació excessiva de la trombina inicialment estimulada per l'elevació del factor VII activat. Aquesta acció important del sistema proteïna C – proteïna S no es traduiria de forma directa en una reducció del factor VII activat però sí que podria impedir l'augment de generació de trombina. En canvi, es pot suposar que en estats de TSH elevada de forma crònica com es donen a l'hipotiroïdisme clínic i subclínic l'eficàcia de l'efecte de control de la del sistema proteïna C – proteïna S acabi sent superat per la major producció i de forma perllongada en el temps del factor VII activat que està sent estimulat per la TSH, i en aquests casos es quan veiem elevació del F1+2, el qual augmenta en el moment en que la protrombina passa a ser trombina, tal com hem observat en el nostre primer estudi en pacients amb hipotiroïdisme. Aquesta disminució de l'acció del sistema proteïna C – proteïna S podria passar sense que necessàriament es produís la disminució dels seus components si no una disminució de la seva funció. Per poder comprovar aquestes hipòtesis sobre l'acció moduladora del sistema proteïna C – proteïna S actuant sobre l'activació de la coagulació induïda per la TSH es podria mesurar la proteïna C activada circulant i així avaluar l'acció del sistema proteïna C – proteïna S. Desafortunadament no existeix actualment una tècnica disponible al nostre abast per quantificar la proteïna C activada en plasma.

Ni durant el nostre estudi ni en d'altres publicats que avaluen el mateix no es va produir cap esdeveniment cardiovascular o trombòtic entre els participants que van rebre

DISCUSSIÓ

rhTSH, probablement degut a que la TSH va estar elevada durant període de temps un molt curt. No és improbable que en l'hipotiroïdisme prolongat, com l'hipotiroïdisme autoimmune, o en l'hipotiroïdisme subclínic no diagnosticat i perpetuat en el temps, l'efecte de les MP procoagulants en el risc cardiovascular i trombòtic sigui més pronunciat.

8.4. EFECTE DIRECTE DE LA TSH SOBRE LA COAGULACIÓ I L'ENDOTELI

Un concepte interessant que s'ha avaluat als nostres estudis és l'efecte que exerceix la TSH directament sobre els òrgans perifèrics i en el nostre cas concret sobre els trastorns de la coagulació. Justament al primer estudi els paràmetres marcadors d'estat protrombòtic es correlacionaven molt millor amb les concentracions de TSH que amb les de T4 lliure, el que fa pensar que l'efecte sobre l'hemostàsia pot ser degut en bona part a l'efecte de la TSH i no al dèficit de T4 o T3 lliures. En aquesta línia, al segon estudi el que s'ha avaluat ha estat l'efecte directe de la TSH sobre els seus receptors corporals, independentment dels valors de T3 i T4 lliure.

La glàndula tiroide expressa receptors per la TSH, però aquests receptors també han estat també descrits a les cèl·lules endotelials humanes (162), al múscul llis de les artèries coronàries humanes (163) i als cardiomiòcits (164). Les MP procoagulants poden sorgir de les cèl·lules endotelials i l'estimulació del receptor de la TSH a les cèl·lules

endotelials, independentment de les modificacions en la T4. Nosaltres proposem que podria induir la formació de MP procoagulants, cosa que en part podria explicar l'augment d'aquestes MP en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic en el nostre primer estudi, ja que aquests pacients van mostrar valors normals d'hormones perifèriques T3 i T4 lliure, i també en els pacients del nostre segon estudi després de l'administració de rhTSH, on les hormones perifèriques també es mantenen normals al llarg dels dies i només augmentava la TSH.

Aquesta activació de les cèl·lules endotelials vasculars suggerida pels nostres estudis concorda perfectament amb els resultats del grup de Desideri (166), on observen l'elevació de molècules que indiquen l'activació de les cèl·lules endotelials i de les plaquetes després de l'administració de rhTSH. Presos en conjunt, els resultats dels dos estudis, encara que no avaluïn els mateixos paràmetres, podrien estar descrivint els mateixos efectes sobre l'activació de l'endoteli vascular per una acció directa de la TSH.

Sense dubte, calen més estudis per dil·lucidar l'efecte directe i independent de la TSH sobre els seus receptors extratiroïdals i sobre les funcions biològiques del cos humà. És de pensar que si existeixen receptors funcional d'aquesta hormona fora de la glàndula tiroide aquests exerceixen efectes sobre el funcionament cel·lular i per tant poden modificar les respostes biològiques corporals.

9. CONCLUSIONS

1. Els pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic presenten una alteració de l'hemostàsia, en el sentit de reflectir un estat procoagulant i protrombòtic amb elevació de factor VII activat, complexos trombina-antitrombina, fragment 1+2 de la protrombina, dímer D i MP procoagulant circulants. L'elevació d'aquests marcadors es correlaciona millor amb els nivells de TSH que amb els de T4 lliure.
2. En els pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic les alteracions de l'hemostàsia en sentit procoagulant i protrombòtic reverteixen mitjançant el tractament amb levotiroxina sòdica, arribant als valors de la normalitat.
3. El pacients amb càncer tiroïdal, quan són sotmesos a tractament amb rhTSH, presenten elevació de les MP procoagulants i del factor VII activat, amb un pic màxim el dia 5 després de l'administració de l'hormona sintètica i normalització dels nivells el dia 10, fet que indica un estat procoagulant i protrombòtic associat a l'administració de rTSH.

10- LÍNIAS DE FUTUR

Els resultats obtinguts en els estudis realitzats que es presenten posen de manifest que poden existir marcadors que reflecteixin canvis en la fisiologia que podrien estar potencialment implicats en l'increment de la malaltia trombòtica i de l'elevat risc cardiovascular dels pacients amb hipotiroïdisme. Aquestes dades introdueixen una nova línia d'investigació en aquesta condició clínica, en la recerca de marcadors que de forma el més acurada possible defineixin com i quan l'hemostàsia es pot veure alterada en aquesta entitat. Això pot arribar a ser molt rellevant principalment en el cas de d'hipotiroïdisme subclínic on hi ha debat científic sobre quan s'ha d'iniciar el tractament substitutiu. L'ús d'aquests marcadors podria ajudar a discriminar quan el tractament substitutiu de l'hipotiroïdisme amb levotiroxina estaria indicat i podria proporcionar protecció enfront el risc cardiovascular d'aquests malalts, risc que resulta deduïble per les dades obtingudes.

Dels marcadors identificats per l'avaluació de l'hemostàsia val la pena considerar, especialment pel que fa a potencials línies de futur, aquells més nous i amb un futur més prometedori. Un d'ells resulta especialment atractiu i és molt probable que sigui el que en els pròxims anys es pugui aprofundir més. Es tracta de les micropartícules procoagulants circulants. Aquest marcador, al qual recentment s'ha treballat en la valoració de la seva importància, té un àmbit d'acció molt ample i pot incidir en molts punts del procés de trombosi i d'arteriosclerosi. Les MP ja estan sent valorades com a biomarcadors molt prometedors i amb un gran potencial per a pronosticar en les diferents malalties en què es troben elevades (221). S'estan establint com a reguladors de la comunicació intercel·lular, en particular en la biologia vascular, ja que a través de la fusió de la seva membrana amb la d'altres cèl·lules en transfereixen el contingut

citoplasmàtic de proteïnes, d'ARN i, fins i tot, d'oncògens (61). S'ha descrit que, a més, les MP actuen en la inflamació augmentant l'expressió de citocines i afavorint l'agregació dels leucòcits, poden modular la resposta immune induint l'apoptosi dels limfòcits T citotòxics, i participen en l'angiogènesi transportant factors de creixement i metaloproteïnasa (61). Per tot això, les MP ens poden donar informació de l'estat vascular i de coagulació dels pacients en diferents situacions clíniques, estat que es podria utilitzar fins i tot per prendre decisions clíniques i de tractament en determinades situacions, com podrien ser l'infart agut de miocardi, conèixer l'estat d'aterotrombosi arterial dels pacient amb diabetis mellitus (assignatura pendent en l'estudi de les complicacions cròniques de la diabetis), o intuir les possibilitats de metàstasi de certs càncers, només per posar alguns exemples. En el cas del nostre estudi, serviria per saber el potencial risc de trombosi dels pacients amb hipotiroïdisme i dels pacients exposats a rhTSH en pacients que han patit un càncer de tiroide, tot i que es necessiten més estudis per analitzar l'efecte.

La línia d'avaluació del paper de les MP procoagulants circulants en d'hipotiroïdisme es podria ampliar en estudis in vitro de caracterització de la seva activitat quan s'obtenen i es purifiquen, cosa que es pot fer rentant-les amb ultracentrifugació, i es podria aplicar no només en pacients amb hipotiroïdisme o exposats a rhTSH, sinó també en pacients amb diferents situacions de patologia tiroïdal. La magnitud i la complexitat de l'efecte sobre l'hemostàsia i el perfil trombòtic en els pacients amb hipotiroïdisme, es podria estudiar avaluant no només l'efecte procoagulant d'aquestes MP en nous assajos ex vivo de generació de trombina, com la complexa prova de Potencial Endogen de Trombina,

sinó també estudiant el seu efecte en la fibrinòlisi, una acció poc estudiada de les MP circulants.

També s'obre una porta a consideracions metodològiques per plantejar si la millora de la metodologia a l'hora de determinar i quantificar les MP reafirma els resultats obtinguts. L'estudi de l'alliberament i la captació de MP, tant en una situació d'estudi in vitro com in vivo, continua sent un repte, doncs no hi ha mètodes fiables de detecció per discriminar cèl·lules que poden absorbir i interaccionar amb les MP de cèl·lules que no ho fan (221). Recentment s'estan desenvolupant noves eines prometedores, una d'elles utilitza el sistema CreloxP que identifica cèl·lules que absorbeixen MP i estan marcades amb fluorescència (222), que ens podran ajudar a determinar, caracteritzar i conèixer la funció de les MP de forma més precisa.

Una altra manera molt interessant d'avaluar l'efecte que pot tenir l'hipotiroïdisme sobre les MP és anant a estudiar les possibles alteracions de la seva estructura, alteracions que podrien ser induïdes per l'augment dels valors de TSH. Aquestes modificacions seria molt interessant estudiar-les per proteòmica de lisat de MP circulants purificades per ultracentrifugació en sang obtinguda de pacients amb diferents situacions de patologia tiroïdal. També es podria avaluar en estudis in vitro amb incubació de les MP amb diferents nivells de TSH.

En relació a les investigacions presents, però ampliant el tipus de malaltia a avaluar, part d'aquests estudis es podrien fer en una situació inversa, l'hipertiroïdisme, en el qual la majoria d'aquest marcadors identificats com a alterats a l'hipotiroïdisme no han estat estudiats.

També els pacients amb càncer tiroïdal i els efectes del seu tractament sobre l'eix hipotàlamo-hipofític-tiroïdal conforma una població molt rellevant per l'estudi d'alguns dels marcadors identificats, molt especialment les MP. Aquestes MP podrien donar informació de l'estat del càncer tiroïdal més enllà de l'estrictament pròpia de la patologia vascular i trombòtica. Estudis in vitro i in vivo han demostrat que les cèl·lules malignes alliberen una gran quantitat de microvesícules de membrana en resposta a la quimioteràpia i, per tant, la seva concentració circulat podria reflectir l'activitat tumoral (113). Les MP derivades de cèl·lules sanguínies en general poden actuar com a potenciadors directes del creixement tumoral mitjançant l'alliberament de factors de creixement potents en el microambient tumoral (211). L'empelt tumoral també pot ser estimulat pels factors proangiogènics alliberats per elles. A més, per les seves funcions proinflamatòries i immunomoduladores, també poden exercir un paper indirecte en el procés metastàtic de múltiples passos en ajudar a les cèl·lules malignes a escapar de la vigilància immunològica (211). Per tant, en l'estudi de les MP en càncer, com podria ser el cas del càncer de tiroïdes, la quantificació de les MP pot ampliar el seu paper i no emprar-se només com a marcador de patologia vascular, sinó que podria ser també útil com a marcador tumoral o d'activitat del càncer. Aquest és un camp que en el càncer en general i específicament el càncer de tiroide ha estat, fins ara, poc explorat i que resulta molt prometedora.

Més enllà dels marcadors estudiats, l'evolució del coneixement de l'hemostàsia amb un grau de complexitat creixent fa que d'altres mecanismes no contemplats fins ara puguin ser interessants com a línies de recerca futures. El model plasmàtic i cel·lular de la coagulació resulta de vegades insuficient per a explicar tot el procés de l'hemostàsia,

especialment de la seva fase inicial, i de la formació de trombes. Les MP ja han servit per a ampliar el model de la coagulació, però recentment s'ha descrit un altre mecanisme d'activació de la coagulació que inclou un nou component cel·lular: els neutròfils, que són molt més abundants a la sang que els monòcits. Els neutròfils poden ser molt rellevants en l'activació de la coagulació per la seva capacitat de formar NETs (neutrophil extracellular traps). Els NETs són DNA, histones i d'altres proteïnes (mieloperoxidasa, elastasa, catepsina G i pèptids microbicides) que provenen dels nuclis dels neutròfils i que són alliberades a l'espai extracel·lular un cop els neutròfils han estat activats (212). Quan per l'activació dels neutròfils es produeix el trencament de la membrana nuclear, a la membrana externa es provoca el fenomen de NETosi en el qual s'alliberen les xarxes de DNA a l'espai extracel·lular al voltant dels neutròfils afectats (Figura 14) (212). Aquests productes de la NETosi queden estructuralment conformats quan estan a l'espai extracel·lular, en aquest cas el plasma sanguini, en forma d'una xarxa adhesiva estructuralment unida per les cadenes de DNA alliberades.

Els NETs són útils per a atrapar i eliminar agents infecciosos (213), que va ser la primera funció que es va identificar. Però els NETs també poden activar el procés de la coagulació (214,215) i promoure la trombosi (216). Els NETs provoquen l'adhesió de les plaquetes a la xarxa de DNA, a la qual també s'hi adhereixen MP amb capacitat d'expressar TF i, d'aquesta manera, es pot activar el sistema de coagulació (217). Aquesta forma d'activació de la coagulació sembla molt rellevant, tant a l'hemostàsia fisiològica com a la patològica.

Figura 14. Procés de NETosi

Formació de NETS

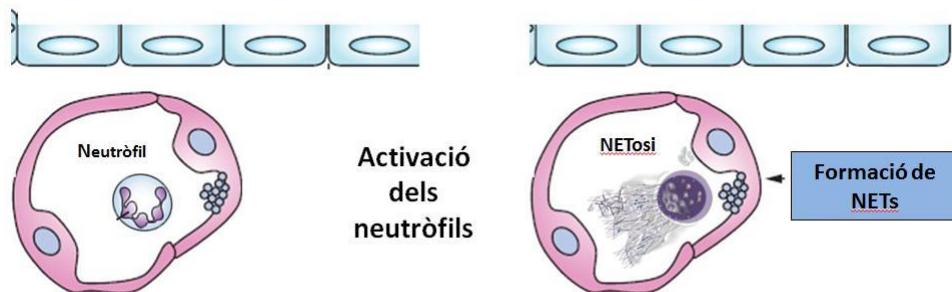


Figura reproduïda amb permís de JC Reverter.

Amb aquest coneixements que complementen els previs, els NETs serien un marcador molt interessant per valorar si també estan augmentats a les malalties de la tiroide. Sobre la situació dels NETs a l'hipotiroïdisme en el moment actual no hi ha cap estudi publicat que els avaluï. Els estudis dels NETs es podrien fer in vitro, a l'estil dels que s'han fet als dos estudis que es presenten i, a més, es podrien dissenyar també estudis in vitro per veure la capacitat dels plasmes dels pacients d'estimular la NETosi en neutròfils aïllats de sang perifèrica.

Els NETs també s'han relacionat amb la malaltia autoimmunitària, la diabetis, l'aterosclerosi, i altres processos de risc cardiovasculars (218). Recentment, el paper dels NETs ha estat estudiat i valorat com a molt rellevant a les lesions arterioscleròtiques on poden contribuir a augmentar la mida de la lesió de la paret vascular i també repercutint negativament en l'estabilitat de la placa (218).

Pel que fa al càncer, s'ha objectivat que els NETs poden proporcionar xarxes amb potencial per modular diverses facetes de la biologia tumoral, incloent les metàstasi, a part d'afavorir la trombosi associada al càncer (219). L'estudi dels NETs al càncer tiroïdal podria, de manera similar al que s'ha comentat abans sobre les micropartícules, contribuir al coneixement i potencialment ampliar el seu paper com a marcador des de la patologia vascular al de marcador tumoral o d'activitat del càncer

L'estudi d'aquests nous marcadors de l'hemostàsia (i també marcadors d'altres processos), les MP i els NETs, conformen, com s'ha comentat, diverses línies d'estudi en el futur en relació a la patologia tiroïdal. La seva avaluació com a marcadors en diverses situacions és un camp prometedor i amb moltes possibilitats, que de segur aportarà noves explicacions a la fisiopatologia de les malalties tiroïdals i poden contribuir en un futur a decidir tractaments més precisos i personalitzats davant d'aquestes patologies.

11- BIBLIOGRAFIA

1. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, et al. Guidelines for the Treatment of Hypothyroidism Prepared by the American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement.
2. Akinci B, Comlekci A, Ozcan M. The Alteration of Coagulation in Patients with Thyroid Dysfunction. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011 Jan 1;5(1):50–7.
3. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Büller H, Gallus A, Hunt BJ, et al. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(7):724–35.
4. Martinelli N, Girelli D, Baroni M, Guarini P, Sandri M, Lunghi B, et al. Activated factor VII-antithrombin complex predicts mortality in patients with stable coronary artery disease: a cohort study. *J Thromb Haemost.* 2016 Apr;14(4):655–66.
5. Dieker J, Tel J, Pieterse E, Thielen A, Rother N, Bakker M, et al. Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Feb;68(2):462–72.
6. Squizzato A, Gerdes VEA. Thyroid disease and haemostasis – a relationship with clinical implications? *Thromb Haemost.* 2010;100(05):727–8.
7. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga W, et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol.* 2006 Jun;154(6):787–803.
8. Lavin N. *Manual of endocrinology and metabolism.* 1166 p.
9. Morris LGT, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid.* 2013 Jul;23(7):885–91.

BIBLIOGRAFIA

10. Luster M, Lippi F, Jarzab B, Perros P, Lassmann M, Reiners C, et al. rhTSH-aided radioiodine ablation and treatment of differentiated thyroid carcinoma: a comprehensive review. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Mar;12(1):49–64.
11. Ruiz-Garcia J, Ruiz de Almodóvar JM, Olea N, Pedraza V. Thyroglobulin level as a predictive factor of tumoral recurrence in differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med*. 1991 Mar;32(3):395–8.
12. McDougall IR, Weigel RJ. Recombinant human thyrotropin in the management of thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2001 Jan;13(1):39–43.
13. Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SI, et al. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Nov;84(11):3877–85.
14. Sans-Sabrafen J. *Hematología clínica*. Elsevier; 2006.
15. González Porras J, Páramo Fernández JA, Mateo Arranz J. *Hemostasia y trombosis. Manual práctico*. Arán ediciones; 2018.
16. Clemetson KJ. Platelet GPIb-V-IX complex. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):266–70.
17. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1335–42.
18. Spronk HMH, Govers-Riemslog JWP, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *BioEssays*. 2003 Dec;25(12):1220–8.
19. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2645–57.
20. Halkar M, Lincoff AM. Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How

- long to continue? *Cleve Clin J Med*. 2016;83(9):675–88.
21. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1604–11.
 22. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2311–5.
 23. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med*. 2003 Apr 24;9(4):458–62.
 24. Rapaport SI, Rao L V. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):7–17.
 25. Camire RM, Bos MHA. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. *J Thromb Haemost*. 2009 Dec;7(12):1951–61.
 26. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. 1997 Nov 15;90(10):3819–43.
 27. Suzuki K, Dahlbäck B, Stenflo J. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem*. 1982 Jun 10;257(11):6556–64.
 28. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol*. 1992 Jul;29(3):213–26.
 29. Tracy PB, Eide LL, Mann KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J Biol Chem*. 1985 Feb 25;260(4):2119–24.
 30. Kane WH, Lindhout MJ, Jackson CM, Majerus PW. Factor Va-dependent binding of

BIBLIOGRAFIA

- factor Xa to human platelets. *J Biol Chem.* 1980 Feb 10;255(3):1170–4.
31. Mosesson MW. The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol.* 1992 Jul;29(3):177–88.
 32. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. [Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine]. *Science.* 1968 May 24;160(3830):892–3.
 33. Bittar LF, De Paula E V., Barnabé A, Mazetto BM, Zapponi KCS, Montalvão SAL, et al. Plasma Factor VIII Levels as a Biomarker for Venous Thromboembolism. *Biomarkers Cardiovasc Dis.* 2015;1–19.
 34. Jesty J, Wun TC, Lorenz A. Kinetics of the inhibition of factor Xa and the tissue factor-factor VIIa complex by the tissue factor pathway inhibitor in the presence and absence of heparin. *Biochemistry.* 1994 Oct 25;33(42):12686–94.
 35. Baugh RJ, Broze GJ, Krishnaswamy S. Regulation of Extrinsic Pathway Factor Xa Formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4378–86.
 36. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood.* 1988 Feb;71(2):335–43.
 37. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem.* 1982 Mar 25;257(6):2912–9.
 38. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost.* 1980 Jun 18;43(2):77–89.

39. Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2003 Apr;89(4):610–21.
40. Hur WS, Mazinani N, Lu XJD, Britton HM, Byrnes JR, Wolberg AS, et al. Coagulation factor XIIIa is inactivated by plasmin. *Blood.* 2015 Nov 12;126(20):2329–37.
41. Vajen T, Mause S, Koenen R. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb Haemost.* 2015 Aug 1;114(08):228–36.
42. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res.* 2008 Jan;123(1):8–23.
43. Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care.* 2015;3(1):2.
44. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Nov;33(8):771–9.
45. Jackson SP, Mangin P, Yuan Y. “Pulling strings”: Shear, platelets, and microparticles. *Blood.* 2006 May 1;107(9):3418–9.
46. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6830–40.
47. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. Weber C, Mause S, editors. *Circ Res.* 2012 Jan 20;110(2):356–69.
48. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999 Jul 1;104(1):93–102.

BIBLIOGRAFIA

49. Hugel B, Socié G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3451–6.
50. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*. 1998 Oct 15;161(8):4382–7.
51. Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2011 Dec 1;2011(1):51–61.
52. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman MR. Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999 Jun;10(4):201–10.
53. Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care*. 2015;3(1):1–11.
54. Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1515–22.
55. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2005 Jan 14;93(1):35–9.
56. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost*. 2006 Jun;4(6):1296–302.
57. Ederhy S, Di Angelantonio E, Mallat Z, Hugel B, Janower S, Meuleman C, et al. Levels of

- circulating procoagulant microparticles in nonvalvular atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2007 Sep 15;100(6):989–94.
58. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 3;45(9):1467–71.
59. Matsumoto N, Nomura S, Kamihata H, Kimura Y, Iwasaka T. Increased level of oxidized LDL-dependent monocyte-derived microparticles in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2004 Jan 30;91(1):146–54.
60. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001 Apr;85(4):639–46.
61. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967 May;13(3):269–88.
62. Reverter JC, Tàssies MD. Estandarización y valor clínico de la cuantificación y caracterización de las micropartículas circulantes. *Haematol (edición española)*. 2011;96 (Suppl.:96 (Suppl. 1): 376-80.
63. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res*. 2011 Apr;127(4):370–7.
64. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov 3;36(8):807–18.
65. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and

BIBLIOGRAFIA

- non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* 2010 Dec;8(12):2596–607.
66. Ayers L, Harrison P, Kohler M, Ferry B. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity.
67. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004 Oct;2(10):1842–3.
68. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles. *Hypertension.* 2006 Aug 1;48(2):180–6.
69. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2009 Apr;96(3):206–12.
70. van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Jorens PG, et al. Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res.* 2010 Apr;125(4):332–9.
71. Roos MA, Gennero L, Denysenko T, Reguzzi S, Cavallo G, Pescarmona GP, et al. Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct.* 2010 Oct;28(7):539–48.
72. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):157–71.
73. Suades R, Padró T, Alonso R, López-Miranda J, Mata P, Badimon L. Circulating CD45+/CD3+ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thromb Haemost.* 2014 Nov

- 29;111(01):111–21.
74. Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost.* 2013 Dec 4;110(08):366–77.
75. Wang J-G, Geddings JE, Aleman MM, Cardenas JC, Chantrathammachart P, Williams JC, et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood.* 2012 Jun 7;119(23):5543–52.
76. Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J.* 2011 Aug 2;32(16):2034–41.
77. Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res.* 2010 Jun;125(6):511–2.
78. Kim HK, Song KS, Chung J-H, Lee KR, Lee S-N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol.* 2004 Feb;124(3):376–84.
79. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating Microparticles From Patients With Myocardial Infarction Cause Endothelial Dysfunction. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2649–52.
80. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):769–75.

BIBLIOGRAFIA

81. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld J-P, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1416–23.
82. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost.* 2001 May;85(5):810–20.
83. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat M-L, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb Haemost.* 2017 Nov 28;117(7):1296–316.
84. Barry OP, FitzGerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):794–800.
85. Mause SF, Von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet Microparticles A Transcellular Delivery System for RANTES Promoting Monocyte Recruitment on Endothelium. 2005;
86. Chow TW, Hellums JD, Thiagarajan P. Thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. *J Lab Clin Med.* 2000 Jan;135(1):66–72.
87. Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Peña E, Padró T, Jiménez-Xarrié E, et al. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. Combes V, editor. *PLoS One.* 2016 Jan 27;11(1):e0148176.
88. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, et al. Elevated platelet

- microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res.* 1993 Nov 15;72(4):295–304.
89. Lopes-Virella MF, Virella G. Immune Mechanisms of Atherosclerosis in Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 1992 Oct 1;41(Supplement_2):86–91.
90. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-Derived Microparticles in Vascular Homeostasis. Weber C, Mause S, editors. *Circ Res.* 2012 Jan 20;110(2):356–69.
91. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated From Human Atherosclerotic Plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Feb 20;49(7):772–7.
92. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariépy J, Freyssinet J-M, et al. Circulating Leukocyte-Derived Microparticles Predict Subclinical Atherosclerosis Burden in Asymptomatic Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Dec;26(12):2775–80.
93. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood.* 1996;88(9):3456–64.
94. Goto S, Tamura N, Eto K, Ikeda Y, Handa S. Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP Iba α induced by conditions of high shear rate. *Circulation.* 2002 May 28;105(21):2531–6.
95. Pontiggia L, Steiner B, Ulrichs H, Deckmyn H, Forestier M, Beer JH. Platelet microparticle formation and thrombin generation under high shear are effectively suppressed by a monoclonal antibody against GPIba. *Thromb Haemost.* 2006 Dec;96(6):774–80.

BIBLIOGRAFIA

96. Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3537–45.
97. Boulanger CM, Amabile N, Guérin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat Z, et al. In Vivo Shear Stress Determines Circulating Levels of Endothelial Microparticles in End-Stage Renal Disease. *Hypertension*. 2007 Apr;49(4):902–8.
98. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1868–76.
99. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes.. *Am Heart J*. 2003 Jun;145(6):962–70.
100. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2004 Dec;97(3):439–46.
101. Chen Y-L, Chen C-H, Wallace CG, Wang H-T, Yang C-C, Yip H-K. Levels of Circulating Microparticles in Patients with Chronic Cardiorenal Disease. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(3):247–56.
102. Amabile N, Rautou P-E, Tedgui A, Boulanger C. Microparticles: Key Protagonists in Cardiovascular Disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov 10;36(08):907–16.
103. Suades R, Padró T, Crespo J, Ramaiola I, Martin-Yuste V, Sabaté M, et al. Circulating microparticle signature in coronary and peripheral blood of ST elevation myocardial infarction patients in relation to pain-to-PCI elapsed time. *Int J Cardiol*. 2016 Jan

- 1;202:378–87.
104. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut J-G, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002 Sep 1;51(9):2840–5.
 105. Ogata N, Nomura S, Shouzu A, Imaizumi M, Arichi M, Matsumura M. Elevation of monocyte-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Sep;73(3):241–8.
 106. Nomura S, Inami N, Kimura Y, Omoto S, Shouzu A, Nishikawa M, et al. Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2007 Jan 19;21(1):38–44.
 107. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Effect of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res*. 2006 Jan;117(4):385–92.
 108. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Long-term treatment with nifedipine modulates procoagulant marker and C-C chemokine in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res*. 2005 Jan;115(4):277–85.
 109. Nomura S, Takahashi N, Inami N, Kajiura T, Yamada K, Nakamori H, et al. Probucol and ticlopidine: effect on platelet and monocyte activation markers in hyperlipidemic patients with and without type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2004 Jun;174(2):329–35.
 110. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2002 Aug 2;16(8):539–47.
 111. Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Detection of

BIBLIOGRAFIA

- monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002 Apr 3;45(4):550–5.
112. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 17;45(10):1622–30.
113. Shimizu M, Tamaki T, Nomura S, Niki M, Nisizawa T. Microparticles as Biomarkers of Blood Coagulation in Cancer. *Biomark Cancer*. 2015;7(Table 1):51–6.
114. Ord WM. On Myxœdema, a term proposed to be applied to an essential condition in the "Cretinoid" Affection occasionally observed in Middle-aged Women. *Med Chir Trans*. 1878 Jan 1;61(1):57-78.5.
115. Monzani F, Di Bello V, Caraccio N, Bertini A, Giorgi D, Giusti C, et al. Effect of levothyroxine on cardiac function and structure in subclinical hypothyroidism: a double blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1110–5.
116. Gencer B, Collet T-H, Virgini V, Bauer DC, Gussekloo J, Cappola AR, et al. Subclinical thyroid dysfunction and the risk of heart failure events: an individual participant data analysis from 6 prospective cohorts. *Circulation*. 2012 Aug 28;126(9):1040–9.
117. Rodondi N, Bauer DC, Cappola AR, Cornuz J, Robbins J, Fried LP, et al. Subclinical thyroid dysfunction, cardiac function, and the risk of heart failure. The Cardiovascular Health study. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Sep 30;52(14):1152–9.
118. Rodondi N, Newman AB, Vittinghoff E, de Rekeneire N, Satterfield S, Harris TB, et al. Subclinical Hypothyroidism and the Risk of Heart Failure, Other Cardiovascular Events, and Death. *Arch Intern Med*. 2005 Nov 28;165(21):2460.

119. Iacoviello M, Guida P, Guastamacchia E, Triggiani V, Forleo C, Catanzaro R, et al. Prognostic role of sub-clinical hypothyroidism in chronic heart failure outpatients. *Curr Pharm Des.* 2008;14(26):2686–92.
120. Manolis AA, Manolis TA, Melita H, Manolis AS. Subclinical thyroid dysfunction and cardiovascular consequences: An alarming wake-up call? *Trends Cardiovasc Med.* 2019 Mar;
121. Monzani F, Caraccio N, Kozàkowà M, Dardano A, Vittone F, Virdis A, et al. Effect of levothyroxine replacement on lipid profile and intima-media thickness in subclinical hypothyroidism: a double-blind, placebo- controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2099–106.
122. Liu D, Jiang F, Shan Z, Wang B, Wang J, Lai Y, et al. A cross-sectional survey of relationship between serum TSH level and blood pressure. *J Hum Hypertens.* 2010 Feb 25;24(2):134–8.
123. Baumgartner C, Bluma MR, Rodondia N. Subclinical hypothyroidism: Summary of evidence in 2014. *Swiss Med Wkly.* 2014;144(December):1–9.
124. Tian L, Zhang L, Liu J, Guo T, Gao C, Ni J. Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Endocrinol.* 2014 Apr;52(2):215–22.
125. Ahirwar AK, Singh A, Jain A, Patra SK, Goswami B, Bhatnagar MK, et al. Raised TSH is associated with endothelial dysfunction in Metabolic Syndrome: A case control study. *Rom J Intern Med.* 2017 Dec 1;55(4):212–21.
126. Huang W, Xu J, Jing F, Chen W-B, Gao L, Yuan H-T, et al. Functional thyrotropin receptor expression in the ventricle and the effects on ventricular BNP secretion. *Endocrine.* 2014 Jun 26;46(2):328–39.

BIBLIOGRAFIA

127. Distler JHW, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*. 2006 Dec 7;39(8):683–90.
128. von Hafe M, Neves JS, Vale C, Borges-Canha M, Leite-Moreira A. The impact of thyroid hormone dysfunction on ischemic heart disease. *Endocr Connect*. 2019 Apr 1;8(5):R76–90.
129. Duntas LH, Brenta G. A Renewed Focus on the Association Between Thyroid Hormones and Lipid Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Sep 3;9:511.
130. Chadarevian R, Bruckert E, Ankri A, Beucler I, Giral P, Turpin G. Relationship between thyroid hormones and plasma D-dimer levels. *Thromb Haemost*. 1998 Jan;79(1):99–103.
131. Müller B, Tsakiris DA, Roth CB, Guglielmetti M, Staub JJ, Marbet GA. Haemostatic profile in hypothyroidism as potential risk factor for vascular or thrombotic disease. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(2):131–7.
132. AKINCI B, COMLEKCI A, ALI OZCAN M, DEMIR T, YENER S, DEMIRKAN F, et al. Elevated Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Antigen Levels in Overt and Subclinical Hypothyroid Patients Were Reduced by Levothyroxine Replacement. *Endocr J*. 2007;54(1):45–52.
133. GULDIKEN S, DEMIR M, TURGUT B, ALTUN BU, ARIKAN E, KARA M. Global Fibrinolytic Capacity in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Endocr J*. 2005;52(3):363–7.
134. Cantürk Z, Çetinarslan B, Tarkun I, Cantürk NZ, Özden M, Duman C. Hemostatic System as a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Women with Subclinical Hypothyroidism. *Thyroid*. 2003 Oct;13(10):971–7.
135. Lupoli R, Di Minno MND, Tortora A, Scaravilli A, Cacciapuoti M, Barba L, et al. Primary

- and Secondary Hemostasis in Patients With Subclinical Hypothyroidism: Effect of Levothyroxine Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jul;100(7):2659–65.
136. KAMEL N, GULLU S, SAV H, BASKAL N, TONYUKUK V, ERDOGAN G. Effects of levothyroxine treatment on biochemical parameters in patients with overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr J.* 2000;47:222.
137. Anagnostis P, Efstathiadou ZA, Slavakis A, Selalmatzidou D, Poulasouchidou M, Katergari S, et al. The effect of L-thyroxine substitution on lipid profile, glucose homeostasis, inflammation and coagulation in patients with subclinical hypothyroidism. *Int J Clin Pract.* 2014 Jul;68(7):857–63.
138. Ozcan MA, Cömlekçi A, Demirkan F, Yüksel F, Sari I, Demir T, et al. Plasma levels of free tissue factor pathway inhibitor in patients with various thyroid disorders. *Thromb Res.* 2003 Jun 1;110(4):243–7.
139. Khan MMH, Hattori T, Niewiarowski S, Edmunds LH, Colman RW. Truncated and microparticle-free soluble tissue factor bound to peripheral monocytes preferentially activate factor VII. *Thromb Haemost.* 2006 Mar 29;95(3):462–8.
140. Jorde R, Figenschau Y, Hansen J-B. Haemostatic function in subjects with mild subclinical hypothyroidism. The Tromsø study. *Thromb Haemost.* 2006 Apr;95(4):750–1.
141. Berezin A, Kremzer A, Martovitskaya Y, Samura T, Berezina T. The association of subclinical hypothyroidism and pattern of circulating endothelial-derived microparticles among chronic heart failure patients. *Res Cardiovasc Med.* 2015;4(4):7.
142. Tomczyńska M, Salata I, Bijak M, Saluk-Bijak J. The potential contribution and role of a blood platelets in autoimmune thyroid diseases. *J Cell Mol Med.* 2018 Dec;22(12):6386–

BIBLIOGRAFIA

- 90.
143. Nielsen CT, Østergaard O, Stener L, Iversen L V, Truedsson L, Gullstrand B, et al. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum.* 2012 Apr;64(4):1227–36.
144. EGEBERG O. THYROID FUNCTION AND HEMOSTASIS. *Scand J Clin Lab Invest.* 1964;16:511–2.
145. Simone J V, Abildgaard CF, Schulman I. Blood coagulation in thyroid dysfunction. *N Engl J Med.* 1965 Nov 11;273(20):1057–61.
146. Bennett NB, Ogston CM, McAndrew GM. The thyroid and fibrinolysis. *Br Med J.* 1967 Oct 28;4(5572):147–8.
147. Chadarevian R, Jublanc C, Bruckert E, Giral P, Ankri A, Leenhardt L, et al. Effect of levothyroxine replacement therapy on coagulation and fibrinolysis in severe hypothyroidism. *J Endocrinol Invest.* 2005 May;28(5):398–404.
148. Yango J, Alexopoulou O, Eeckhoudt S, Hermans C, Daumerie C. Evaluation of the respective influence of thyroid hormones and TSH on blood coagulation parameters after total thyroidectomy. *Eur J Endocrinol.* 2011 Apr;164(4):599–603.
149. Verkleij CJN, Stuijver DJF, van Zaane B, Squizzato A, Brandjes DPM, Büller HR, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in hypothyroidism and hyperthyroxinaemia. *Thromb Haemost.* 2013;109(2):214–20.
150. STUIJVER DJF, HOOPER JMW, ORME SM, Van ZAANE B, SQUIZZATO A, PIANTANIDA E, et al. Fibrin clot structure and fibrinolysis in hypothyroid individuals: the effects of normalising thyroid hormone levels. *J Thromb Haemost.* 2012;10(8):1708–10.

151. Palareti G, Biagi G, Legnani C, Bianchi D, Serra D, Savini R, et al. Association of reduced factor VIII with impaired platelet reactivity to adrenalin and collagen after total thyroidectomy. *Thromb Haemost.* 1989 Dec 29;62(4):1053–6.
152. Yango J, Alexopoulou O, Eeckhoudt S, Hermans C, Daumerie C. Evaluation of the respective influence of thyroid hormones and TSH on blood coagulation parameters after total thyroidectomy. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(4):599–603.
153. Stuijver DJF, Piantanida E, van Zaane B, Galli L, Romualdi E, Tanda ML, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with overt hypothyroidism: a prospective cohort study. *Haemophilia.* 2014 May;20(3):326–32.
154. Marongiu F, Biondi G, Conti M, Murtas ML, Mameli G, Sorano GG, et al. Is a hypercoagulable state present in hypothyroidism? *Thromb Haemost.* 1992 Jun 1;67(6):729.
155. Chadarevian R, Bruckert E, Giral P, Turpin G. Relationship between thyroid hormones and fibrinogen levels. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999 Dec;10(8):481–6.
156. Cetinkalp S, Tobu M, Karadeniz M, Buyukkeçeci F, Yilmaz C. The Effect of Hormone Replacement Treatment on Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Activity Levels in Patients with Hashimoto Thyroiditis. *Intern Med.* 2009;48(5):281–5.
157. Debeij J, Cannegieter SC, Van Zaane B, Smit JWA, Corssmit EPM, Rosendaal FR, et al. The effect of changes in thyroxine and thyroid-stimulating hormone levels on the coagulation system. *J Thromb Haemost.* 2010;8(12):2823–6.
158. Erem C, Ucuncu O, Yilmaz M, Kocak M, Nuhoglu I, Ersoz HO. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and decreased tissue factor pathway inhibitor in patients with hypothyroidism. *Endocrine.* 2009 Feb;35(1):75–80.

BIBLIOGRAFIA

159. Erem C, Kavgaci H, Ersöz HO, Hacıhasanoğlu A, Ukiñç K, Karti SS, et al. Blood coagulation and fibrinolytic activity in hypothyroidism. *Int J Clin Pract.* 2003 Mar;57(2):78–81.
160. Squizzato A, Romualdi E, Büller HR, Gerdes VEA. Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2415–20.
161. Ordookhani A, Burman KD. Hemostasis in Hypothyroidism and Autoimmune Thyroid Disorders. *Int J Endocrinol Metab.* 2017 Mar 9;In press(In press):e42649.
162. Donnini D, Ambesi-Impiombato FS, Curcio F. Thyrotropin stimulates production of procoagulant and vasodilative factors in human aortic endothelial cells. *Thyroid.* 2003 Jun;13(6):517–21.
163. Sellitti DF, Dennison D, Akamizu T, Doi SQ, Kohn LD, Koshiyama H. Thyrotropin regulation of cyclic adenosine monophosphate production in human coronary artery smooth muscle cells. *Thyroid.* 2000 Mar;10(3):219–25.
164. Drvota V, Janson A, Norman C, Sylvén C, Häggblad J, Brönnegård M, et al. Evidence for the presence of functional thyrotropin receptor in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 15;211(2):426–31.
165. Whetsell M, Bagriacik EU, Seetharamaiah GS, Prabhakar BS, Klein JR. Neuroendocrine-induced synthesis of bone marrow-derived cytokines with inflammatory immunomodulating properties. *Cell Immunol.* 1999 Mar 15;192(2):159–66.
166. Desideri G, Bocale R, Milardi D, Ghiadoni L, Grassi D, Necozone S, et al. Enhanced proatherogenic inflammation after recombinant human TSH administration in patients monitored for thyroid cancer remnant. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(3):429–33.
167. Burger D, Gagnon A, Lochnan HA, Mahzari M, Sorisky A. Thyroid-stimulating hormone

- acutely increases levels of circulating pro-coagulant microparticles. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;83(2):285–7.
168. CLAUSS A. [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. *Acta Haematol*. 1957 Apr;17(4):237–46.
169. Abildgaard U, Lie M, Odegård OR. Antithrombin (heparin cofactor) assay with “new” chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). *Thromb Res*. 1977 Oct;11(4):549–53.
170. Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-van Es C, van Wijngaarden A. The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of the heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb Haemost*. 1984 Feb 28;51(1):1–5.
171. Amiral J, Grosley B, Boyer-Neumann C, Marfaing-Koka A, Peynaud-Debayle E, Wolf M, et al. New direct assay of free protein S antigen using two distinct monoclonal antibodies specific for the free form. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):179–86.
172. Nilsson K, Rosén S, Friberger P. A new kit for the determination of tissue plasminogen activator and its inhibitor in blood. *Fibrinolysis*. 1987 Jul 1;1(3):163–8.
173. Chmielewska J, Rånby M, Wiman B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res*. 1983 Aug 1;31(3):427–36.
174. Friberger P. Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1982;162:1–298.
175. Juhan-Vague I, Alessi MC, Fossat C, Declerck PJ, Kruithof EK. Plasma determination of plasminogen activator inhibitor 1 antigen must be performed in blood collected on

BIBLIOGRAFIA

- antiplatelet/anticoagulant mixture. *Thromb Haemost.* 1987 Dec 18;58(4):1096.
176. Pelzer H, Schwarz A, Stüber W. Determination of human prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemost.* 1991 Feb 12;65(2):153–9.
177. Bruhn H, Conard J, Mannucci M, Monteagudo J, Pelzer H, Reverter J, et al. Multicentric Evaluation of a New Assay for Prothrombin Fragment F1+2 Determination. *Thromb Haemost.* 1992 Oct 4;68(04):413–7.
178. van Oosterom AT, Kerkhoven P, Veltkamp JJ. Metabolism of the coagulation factors of the prothrombin complex in hypothyroidism in man. *Thromb Haemost.* 1979 Apr 23;41(2):273–85.
179. Girard TJ, Broze GJ. [11] Tissue factor pathway inhibitor. In: *Methods in enzymology.* 1993. p. 195–209.
180. Morrissey J, Macik B, Neuenschwander P, Comp P. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 1993;81(3).
181. Neuenschwander PF, Morrissey JH. Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor function. Analysis of a mutant with a selective deficiency in activity. *J Biol Chem.* 1992 Jul 15;267(20):14477–82.
182. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, et al. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Nov;16(11):1319–26.

183. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer DS, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Hauger BR, Kloos RT, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1167–214.
184. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1–133.
185. Ågren A, Wiman B, Schulman S. Laboratory evidence of hyperfibrinolysis in association with low plasminogen activator inhibitor type 1 activity. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007 Oct;18(7):657–60.
186. Squizzato A, Romualdi E, Büller HR, Gerdes VEA. Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: A systematic review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2415–20.
187. Erem C, Ucuncu O, Yilmaz M, Kocak M, Nuhoglu İ, Ersoz HO. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and decreased tissue factor pathway inhibitor in patients with hypothyroidism. *Endocrine*. 2009 Feb;35(1):75–80.
188. Ford HC, Carter JM. Haemostasis in hypothyroidism. *Postgrad Med J*. 1990 Apr 1;66(774):280–4.
189. Ermantas N, Guldiken S, Demir M, Tugrul A. Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Antigen and Activity Assay in Patients With Primary Hypothyroidism. *Clin Appl Thromb*. 2010 Oct 2;16(5):568–73.

BIBLIOGRAFIA

190. LOELIGER EA, VAN DER ESCH B, MATTERN MJ, HEMKER HC. THE BIOLOGICAL DISAPPEARANCE RATE OF PROTHROMBIN, FACTORS VII, IX AND X FROM PLASMA IN HYPOTHYROIDISM, HYPERTHYROIDISM, AND DURING FEVER. *Thromb Diath Haemorrh.* 1964 Jan 1;10:267–77.
191. van Oosterom AT, Mattie H, Hermens WT, Veltkamp JJ. The influence of the thyroid function on the metabolic rate of prothrombin, factor VII, and factor X in the rat. *Thromb Haemost.* 1976 Jun 30;35(3):607–19.
192. Shih CH, Chen SL, Yen CC, Huang YAH, Chen CDE, Lee YS, et al. Thyroid hormone receptor-dependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins. *Endocrinology.* 2004;145(6):2804–14.
193. Morrissey JH. Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance. *Haemostasis.* 1996;26 Suppl 1(1):66–71.
194. Danielsen R, Onundarson PT, Thors H, Vidarsson B, Morrissey JH. Activated and total coagulation factor VII, and fibrinogen in coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J.* 1998;32(2):87–95.
195. Taubman MB, Giesen PL, Schechter AD, Nemerson Y. Regulation of the procoagulant response to arterial injury. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):801–5.
196. Perk M, O'Neill BJ. The effect of thyroid hormone therapy on angiographic coronary artery disease progression. *Can J Cardiol.* 1997 Mar;13(3):273–6.
197. Klein I, Danzi S. Thyroid Disease and the Heart. *Curr Probl Cardiol.* 2016 Feb;41(2):65–92.
198. Ozturk S, Alcelik A, Ozyasar M, Dikbas O, Ayhan S, Ozlu F, et al. Evaluation of left ventricular systolic asynchrony in patients with subclinical hypothyroidism. *Cardiol J.*

- 2012;19(4):374–80.
199. Meena CL, Meena RD, Nawal R, Meena VK, Bharti A, Meena LP. Assessment of left ventricular diastolic dysfunction in sub-clinical hypothyroidism. *Acta Inform Med.* 2012 Dec;20(4):218–20.
 200. Chen S, Shauer A, Zwas DR, Lotan C, Keren A, Gotsman I. The effect of thyroid function on clinical outcome in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2014 Feb;16(2):217–26.
 201. Rodondi N, den Elzen WPJ, Bauer DC, Cappola AR, Razvi S, Walsh JP, et al. Subclinical Hypothyroidism and the Risk of Coronary Heart Disease and Mortality. *JAMA.* 2010 Sep 22;304(12):1365.
 202. Razvi S, Weaver JU, Vanderpump MP, Pearce SHS. The incidence of ischemic heart disease and mortality in people with subclinical hypothyroidism: reanalysis of the Whickham Survey cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;95(4):1734–40.
 203. Walsh JP, Bremner AP, Bulsara MK, O’Leary P, Leedman PJ, Feddema P, et al. Subclinical Thyroid Dysfunction as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Arch Intern Med.* 2005 Nov 28;165(21):2467.
 204. Hak AE, Pols HA, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med.* 2000 Feb 15;132(4):270–8.
 205. Viswanathan G, Balasubramaniam K, Hardy R, Marshall S, Zaman A, Razvi S. Blood thrombogenicity is independently associated with serum TSH levels in post-non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jun;99(6):E1050-4.

BIBLIOGRAFIA

206. Kovářová M, Koller T, Štvrtinová V, Payer J. Thyroid-stimulating hormone concentration as an independent risk factor of venous thromboembolism regardless of thyroid function. *Endokrynol Pol.* 2015 Dec 7;66(6):474–9.
207. Biondi B, Cooper DS. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr Rev.* 2008 Feb 1;29(1):76–131.
208. Razvi S, Ingoe L, Keeka G, Oates C, McMillan C, Weaver JU. The beneficial effect of L-thyroxine on cardiovascular risk factors, endothelial function, and quality of life in subclinical hypothyroidism: randomized, crossover trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 May;92(5):1715–23.
209. STRICKER H, COLUCCI G, ALBERIO L, MOMBELLI G. Variation in coagulation inhibitors during prolonged sitting: possible pathogenetic mechanisms for travel-associated thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006 Apr 1;4(4):900–2.
210. Schobersberger W, Fries D, Mittermayr M, Innerhofer P, Sumann G, Schobersberger B, et al. Changes of biochemical markers and functional tests for clot formation during long-haul flights. *Thromb Res.* 2002 Oct 1;108(1):19–24.
211. Jaiswal R, Sedger LM. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol.* 2019 Mar 6;9:125.
212. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol.* 2012 Sep 15;189(6):2689–95.
213. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-).* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.

214. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012 Sep 3;198(5):773–83.
215. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2015 Jul;14(7):633–40.
216. Noubouossie DF, Reeves BN, Strahl BD, Key NS. Neutrophils: back in the thrombosis spotlight. *Blood.* 2019 May 16;133(20):2186–97.
217. Rao AN, Kazzaz NM, Knight JS. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World J Cardiol.* 2015 Dec 26;7(12):829.
218. Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F, Lüscher TF, Camici GG, et al. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2019 Jul 1;115(8):1266–85.
219. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Aug 7;109(32):13076–81.

12- ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Principals característiques dels mètodes per a la mesura de les MP circulants.

Taula 2: Dades clíniques dels controls i dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic.

Taula 3: Resultats de les determinacions dels paràmetres bioquímics al moment basal del grup control, hipotiroïdisme subclínic i hipotiroïdisme clínic.

Taula 4: Resultats de les determinacions dels paràmetres hormonals al moment basal dels controls i dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic clínic.

Taula 5: Resultats de les determinacions dels paràmetres de l'hemostàsia al moment basal dels controls i dels pacients amb hipotiroïdisme subclínic clínic.

Taula 6: Resultats de les determinacions analítiques abans i després del tractament amb levotiroxina sòdica en els pacients amb hipotiroïdisme subclínic.

Taula 7: Resultats de les determinacions analítiques abans i després del tractament amb levotiroxina sòdica en els pacients amb hipotiroïdisme clínic.

Taula 8: Paràmetres de l'hemostàsia en controls i pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic abans del tractament i 6 mesos després.

Taula 8 continuació: Paràmetres de l'hemostàsia en controls i pacients amb hipotiroïdisme subclínic i clínic abans del tractament i 6 mesos després (continuació)

Taula 9. Correlació entre les variables de l'hemostàsia avaluades i la TSH i la T4 lliure en el grup amb hipotiroïdisme subclínic i clínic de forma conjunta.

Taula 10. Dades clíniques dels pacients sotmesos a rhTSH.

ÍNDEX DE TAULES

Taula 11: Resultats de les determinacions analítiques basals abans de l'administració de rhTSH.

Taula 12: Resultats de les determinacions analítiques després de l'administració de rhTSH.

13- ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Histologia del carcinoma papil·lar de tiroide.

Figura 2. Esquema d'administració de rhTSH (Thyrogen®), de radioiode i canvis en els nivells de la TSH al llarg dels dies.

Figura 3. Agregació plaquetària.

Figura 4. Representació clàssica de la cascada de coagulació incloses les seves quatre vies (iniciació, amplificació, propagació i estabilització).

Figura 5. Mida relativa de les MP en comparació amb les plaquetes.

Figura 6. Factors precipitants de la formació de MP i els seus efectes.

Figura 7. Mètode Elisa de determinació de MP.

Figura 8. MP vistes per microscòpia electrònica.

Figura 9. Interacció entre l'hipotiroïdisme subclínic i la disfunció ventricular diastòlica.

Figura 10. Esquema d'administració de la rhTSH.

Figura 11. Esquema de l'administració de rhTSH i de les determinacions analítiques realitzades al llarg dels dies de l'estudi.

Figura 12. Evolució de la concentració de la TSH i les MP procoagulants des d'abans de l'administració de la rhTSH i durant els 10 dies de seguiment posteriors a l'administració de rhTSH.

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 13. Evolució de la concentració de la TSH i del Factor VII activat des d'abans de l'administració de la rhTSH i durant els 10 dies de seguiment posteriors a l'administració de rhTSH.

Figura 14. Procés de NETosi.

