

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL II

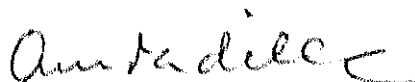


ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE  
HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR

ANA MARIA PADILLA MARROQUÍN  
MADRID 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL II

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE  
HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR



Memoria presentada para optar al grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas por  
ANA MARIA PADILLA MARROQUÍN

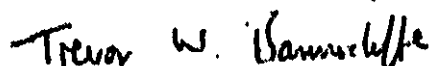
MADRID 1994

**Dr Trevor W Barrowcliffe, Jefe de la División de Hematología del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Herts EN6 3QG, Reino Unido**

**INFORMA:** Que la Memoria que presenta Dña Ana María Padilla Marroquín, titulada "ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR", corresponde a un proyecto de investigación realizado bajo mi dirección en la División de Hematología del NIBSC. Este proyecto ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.

El trabajo realizado por Dña Ana M<sup>a</sup> Padilla supone una contribución original en este importante área de investigación y lo considero apto para su presentación como Tesis Doctoral en la Universidad Complutense de Madrid.

Potters Bar, 29 Mayo de 1994

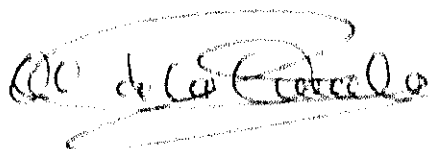


Fdo Dr Trevor W Barrowcliffe

Dña Mónica de la Fuente, Catedrática de Biología Animal de la Universidad  
Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que como Co-Directora de esta tesis en España, he tenido  
conocimiento exhaustivo del planteamiento y ejecución de la investigación  
realizada, considerando que reúne, por su calidad y rigor científico, los  
requisitos para optar al grado de Doctor.

Madrid, 28 de Junio de 1994

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mónica de la Fuente', enclosed within a hand-drawn oval scribble.

Fdo. Dra. Mónica de la Fuente

## **AGRADECIMIENTOS**

**Desde estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de una u otra forma a la realización del presente trabajo:**

**Al Dr. Trevor W. Barrowcliffe, Director de esta tesis, por su orientación científica y ayuda incondicional en la realización de este proyecto.**

**A la Dra. Elaine Gray, por acogerme en su Laboratorio y prestarme su valioso apoyo para que pudiera realizar el modelo animal de trombosis venosa.**

**A la Dra. Barbara Mulloy, por su ayuda en mis devaneos iniciales con el método de HPLC de Heparinas de Bajo Peso Molecular.**

**A todos los compañeros y compañeras del NIBSC, de la División de Hematología y del Instituto en general, que se prestaron voluntariamente como Donantes de Sangre, por su inestimable y desinteresada colaboración con mi trabajo.**

**A la Dra. Mónica de la Fuente, por su confianza al aceptar la Co-Dirección de esta tesis en España. Su interés, comprensión y eficaz ayuda han contribuido de manera definitiva a hacer posible su presentación.**

**A mis "Ayudas" del Word Perfect y Harvard Graphics, Maribel Costa, Narciso López, Teresa Cepeda y Jesús Colino que han puesto a mi disposición tantos conocimientos y paciencia para la ejecución de esta Memoria.**

**No puedo olvidar desde luego la colaboración, ánimo y afecto de todos mis compañeros de trabajo en el Departamento de Productos Biológicos y en el Centro Nacional de Farmacobiología: al Dr. Vicente Gómez Parra por apoyar**

mi estancia en el NIBSC; a los Dres. Sacramento Rico y Francisco Salmerón por sus pacientes revisiones de la traducción de este trabajo inicialmente redactado en inglés; a Esperanza Venero, Maite Huescar, Avelina González y Clemorisa Martín por su generosidad cubriendo otras labores para que el trabajo que ahora se presenta pudiera ser correctamente finalizado. También quiero recordar a todas las personas con las que he compartido buenos momentos y que han sido a la vez compañeras y amigas, especialmente a Elena Primo, M<sup>a</sup> Isaura Gómez-Reino, Gube Alcalde y Dra Esperanza Porqueras.

Por último, un muy afectuoso recuerdo a Angela Walters y Tony Baxter, por su inestimable acogida en Hillcrest Cottage, lugar que tanto me ayudó a redactar, inicialmente en inglés, la memoria que se presenta.

A todos Gracias!

**A mi pequeña gran familia**

## ABREVIATURAS

<b>AbC</b>	<b>Área bajo la curva</b>
<b>alla</b>	<b>Actividad anti-IIa</b>
<b>APTT</b>	<b>Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada</b>
<b>ATIII, AT</b>	<b>Antitrombina III</b>
<b>aXa</b>	<b>Actividad anti-Xa</b>
<b>CAG</b>	<b>Citrato-Albúmina-Glyoxalino</b>
<b>CE50</b>	<b>Concentración eficaz 50%</b>
<b>CEEB</b>	<b>Comité de Expertos de la Estandarización Biológica</b>
<b>CLX</b>	<b>Clexane</b>
<b>CPD</b>	<b>Citrato-Fosfato-Dextrosa</b>
<b>CTC-3</b>	<b>Control de trombocitos</b>
<b>Da</b>	<b>Daltons</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido Etilendiaminotetraacético</b>
<b>F4P</b>	<b>Factor 4 Plaquetario</b>
<b>F4P(PI)</b>	<b>Patrón Internacional de F4P</b>
<b>F4P(R)</b>	<b>Reactivo de F4P</b>
<b>Fig</b>	<b>Figura</b>
<b>FL</b>	<b>Fosfolípido</b>
<b>FRG</b>	<b>Fragmin</b>
<b>FRX</b>	<b>Fraxiparina</b>
<b>FT</b>	<b>Factor Tisular</b>
<b>HBPM</b>	<b>Heparina de Bajo Peso Molecular</b>
<b>HBPM(PI)</b>	<b>Patrón Internacional de HBPM</b>
<b>HNF</b>	<b>Heparina No Fraccionada</b>
<b>HNF(PI)</b>	<b>Patrón Internacional de HNF</b>
<b>HPSEC</b>	<b>Cromatografía de Exclusión Molecular de Alta Eficacia</b>
<b>IR</b>	<b>Índice de Refracción</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltons</b>



$\lambda$	Longitud de onda
log	Logaritmo
LOG	Logiparin
min	Minutos
ml	Mililitros
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMMP	Diseño Patrón-Muestra-Muestra-Patrón
MPPM	Diseño Muestra-Patrón-Patrón-Muestra
pNA	p-nitroanilina
p.e.	Por ejemplo
PI	Patrón Internacional
PM	Peso molecular
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
rpm	Revoluciones por minuto
sec	Sección
seg, segs	Segundos
TTS	Tampón Tris Salino
TVP	Trombosis Venosa Profunda
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta

## RESUMEN

Una de las principales diferencias entre HNF y las HBPM es que las HBPM tienen todas menor actividad anti-IIa que anti-Xa; sin embargo, cuál de estas dos actividades *in vitro* tiene más importancia para su acción antitrombótica *in vivo* es todavía una cuestión de debate. En los últimos años, varios estudios han demostrado que la inhibición de la generación de trombina global constituye un parámetro más útil que los ensayos convencionales anti-Xa y anti-IIa para predecir la eficacia de HNF, HBPM u otros polisacáridos sulfatados.

Para ayudar a explicar la relación entre actividad antitrombótica y los efectos anticoagulantes de estas preparaciones, se ha estudiado la acción de una serie de HBPM comerciales sobre la generación de trombina en plasma, en presencia y ausencia de F4P o plaquetas, y la capacidad de estas preparaciones para prevenir la formación del trombo en un modelo de estasis venosa en el conejo, en comparación con su precursor HNF. Obtenida esta información, se ha analizado la correlación entre su eficacia antitrombótica *in vivo*, su capacidad para inhibir generación de trombina y sus actividades anti-Xa y anti-IIa determinadas en ensayos anticoagulantes convencionales.

Los datos que se presentan en esta memoria muestran que las actividades anti-Xa *in vitro* no son un buen pronóstico de la acción antitrombótica. Por el contrario, las actividades anti-IIa y la inhibición de la generación de trombina en el sistema intrínseco se correlacionan bien con los efectos antitrombóticos de las HBPM. Aunque la neutralización de heparinas por F4P parecía tener una importancia fundamental respecto a la concentración de HNF y de las HBPM requeridas para inhibir generación de trombina *in vitro*, este efecto puede no ser relevante en la prevención de trombosis venosa donde se considera que el papel de las plaquetas no es tan importante como en la trombosis arterial.

Los efectos encontrados no están necesariamente relacionados con la situación terapéutica conocida hasta el momento, pero cualquier efecto que pueda demostrarse que no ejerce un papel relevante en los sistemas referidos es muy poco probable que sea importante, aún cuando se haya demostrado que ocurre en sistemas más purificados. En este sentido el plasma coagulante puede considerarse como un modelo *ex vivo* y constituye un paso más cercano a la realidad fisiológica que el de los sistemas *in vitro*, utilizando factores purificados.

# Í N D I C E

## I. INTRODUCCIÓN

I.1	REACCIONES DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE .....	2
I.2	REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE TROMBINA .....	4
I.3	EFFECTO DE HEPARINA SOBRE LAS REACCIONES ENTRE ATIII Y PROTEASAS DE LA COAGULACIÓN .....	7
I.4	RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE HEPARINA Y SU PESO MOLECULAR .....	10
I.5	HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR .....	11
I.6	ACCIONES ANTICOAGULANTES DE LAS HBPM .....	14
I.6.1	Inhibición de Trombina y Factor Xa .....	14
I.6.2	Inhibición de Generación de Trombina .....	17
I.6.3	Interacción con Proteínas Neutralizantes de Heparina .....	18
I.7	ACCIÓN ANTITROMBÓTICA EN MODELOS ANIMALES .....	19
I.7.1	Acción antitrombótica y actividad anti-Xa .....	19
I.7.2	Acción antitrombótica y actividad anti-IIa .....	21
I.8	RELEVANCIA CLÍNICA DE LAS ACTIVIDADES ANTI-Xa Y ANTI-IIa ....	22

## II. OBJETIVOS

II.1	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	26
------	---------------------------------	----

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1 MATERIALES

#### III.1.1 Patrones

1.1.1	4º Patrón Internacional de HNF .....	29
1.1.2	1º Patrón Internacional de HBPM .....	29
1.1.3	1º Patrón Internacional de Trombina Humana .....	30
1.1.4	1º Patrón Internacional de $\alpha$ -Trombina Humana .....	30
1.1.5	1º Patrón Internacional de F4P Humano Purificado .....	31
1.1.6	Calibrador de Peso Molecular para HBPM .....	31

III.1.2	<u>HBPM Comerciales</u>	32
III.1.3	<u>Reactivos</u>	
1.3.1	Plasma Humano Normal	32
1.3.2	Suero Humano Normal	33
1.3.3	Fibrinógeno Bovino	34
1.3.4	Fosfolípido de Cerebro Bovino	34
1.3.5	Arvin (Ancrod)	34
1.3.6	Control de Trombocitos CTC-3	35
1.3.7	ATIII Humana	35
1.3.8	Trombina Humana	35
1.3.9	Factor Xa Bovino	35
1.3.10	Factor Xa Humano	36
1.3.11	F4P Purificado Humano	36
1.3.12	Otros Reactivos	37
III.1.4	<u>Tampones y Diluyentes</u>	
1.4.1	Solución Salina Normal	38
1.4.2	Tampón Tris Salino	39
1.4.3	Tampón Tris Salino Albúmina	39
1.4.4	Tampón Tris Salino Albumina, 40 mM CaCl <sub>2</sub>	39
1.4.5	Tampón Citrato-Albúmina-Glyoxalino	39
1.4.6	Tampón Tris EDTA	40
1.4.7	Tampón Tris EDTA Albúmina	40
1.4.8	Solución de Acetato Amónico 0.1 M	40
1.4.9	Soluciones de Cloruro Cálcico 3mM y 25 mM	40
1.4.10	Diluyente de F4P	41
1.4.11	Diluyente de Fosfolípido	41
1.4.12	Suspensión de Caolín	41
1.4.13	Solución de Acido Acético 10%	41
III.1.5	<u>Instrumental</u>	41
III.1.6	<u>Material Biológico (Animales)</u>	43

III.1.7	<u>Otros Materiales</u> .....	43
III.2	<b>MÉTODOS</b>	
III.2.1	Cromatografía de Exclusión Molecular de Alta Eficacia .....	46
III.2.2	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada .....	51
III.2.3	Métodos de Ensayo Amidolíticos	
2.3.1	Inhibición de Factor Xa .....	57
2.3.2	Inhibición de Factor Xa en presencia de F4P .....	62
2.3.3	Inhibición de Factor Xa en presencia de F4P y Calcio .....	64
2.3.4	Inhibición de Factor IIa .....	65
2.3.5	Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P .....	69
2.3.6	Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P y Plasma Desfibrinado .....	70
2.3.7	Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P y Calcio .....	70
2.3.8	Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P, Calcio y Fosfolípido .....	71
III.2.4	Generación de Trombina en PPP .....	72
III.2.5	Generación de Trombina en PPP en presencia de F4P .....	76
III.2.6	Neutralización de heparina por F4P: Método de Cálculo .....	77
III.2.7	Generación de Trombina en PRP .....	78
III.2.8	Modelo de Trombosis por Estasis Venosa en Conejo .....	82
III.2.9	Análisis Estadísticos .....	87

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **IV.1 CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* DE LAS HBPM COMERCIALES**

IV.1.1	Actividades Específicas Anti-Xa y Anti-IIa .....	91
IV.1.2	Distribución del Tamaño Molecular .....	95
IV.1.3	Discusión.....	97

##### **IV.2 INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN PPP POR HNF Y HBPM**

IV.2.1	Curva Trombina-Fibrinógeno.....	99
IV.2.2	Inhibición de Generación de Trombina por HNF (PI) .....	101

IV.2.3	Inhibición de Generación de Trombina por HBPM (PI) .....	103
IV.2.4	Comparación de los efectos de HNF (PI) y HBPM (PI) .....	105
IV.2.5	Inhibición de Generación de Trombina por HBPM Comerciales .....	107
IV.2.6	Correlación de las potencias inhibitorias de generación de trombina en PPP con las actividades anti-Xa y anti-IIa .....	119
IV.2.7	Discusión .....	120
IV.3	<b>NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD APTT DE HNF Y HBPM</b>	
IV.3.1	Patrón Internacional de HNF + Patrón Internacional de F4P ..	122
IV.3.2	Patrón Internacional de HNF + Preparación de F4P 82/648 ..	125
IV.3.3	Patrón Internacional de HNF + Preparación F4P (R) .....	126
IV.3.4	Patrón Internacional de HBPM + Preparación F4P (R) .....	129
IV.3.5	HBPM Comerciales + Preparación F4P (R) .....	130
IV.3.6	Discusión .....	132
IV.4	<b>NEUTRALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES INHIBITORIAS DE GENERACIÓN DE TROMBINA, ANTI-Xa Y ANTI-IIa DE HNF Y HBPM</b>	
IV.4.1	Efecto de F4P sobre las Actividades Biológicas de Generación de Trombina, Anti-Xa y Anti-IIa .....	134
IV.4.2	Efecto de F4P en Ensayos Anti-IIa con Plasma Desfibrinado ...	140
IV.4.3	Efecto de F4P en Ensayos Anti-Xa y Anti-IIa en presencia de Calcio .....	143
IV.4.4	Efecto de F4P en Ensayos Anti-IIa en presencia de Calcio y Fosfolípido .....	143
IV.4.5	Discusión .....	146
IV.5	<b>INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN PRP POR HNF Y HBPM</b>	
IV.5.1	Curva Trombina-Fibrinógeno .....	148
IV.5.2	Generación de Trombina en PRP .....	150
IV.5.3	Inhibición de Generación de Trombina por HNF (PI) .....	154
IV.5.4	Inhibición de Generación de Trombina por HBPM (PI) .....	156

IV.5.5	Inhibición de Generación de Trombina por HBPM Comerciales .....	158
IV.5.6	Comparación con el Sistema de PPP en ausencia de F4P .....	166
IV.5.7	Comparación con el Sistema de PPP en presencia de F4P .....	169
IV.5.8	Correlación de las Potencias Inhibitorias de Generación de Trombina en PRP y PPP y con Actividades Anti-Xa y Anti-IIa...	170
IV.5.9	Discusión .....	171
IV.6	ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE HNF Y HBPM COMERCIALES	
IV.6.1	Curvas Dosis-Respuesta de HNF y de HBPM Comerciales .....	173
IV.6.2	Potencia Antitrombótica de HBPM Comerciales .....	181
IV.6.3	Correlación con Actividad Inhibitoria de Generación de Trombina .....	183
IV.6.4	Correlación con Actividades Anticoagulantes Anti-Xa y Anti-IIa .....	184
IV.6.5	Actividades Biológicas en el Conejo .....	185
IV.6.6	Discusión .....	186
V.	<u>DISCUSIÓN GENERAL</u> .....	189
VI.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	206
VII.	<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	209



## 1. INTRODUCCIÓN

## I.1 REACCIONES DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE

Como consecuencia del enorme progreso de la bioquímica de la coagulación, especialmente en los últimos quince a veinte años, que ha dado lugar al aislamiento y purificación de las proteínas que participan en este proceso así como a detallados estudios enzimológicos de sus interacciones, es ahora posible desarrollar un esquema práctico de las reacciones bioquímicas que intervienen en la cascada de la coagulación. Existe en la actualidad un consenso para explicar el mecanismo de la coagulación de la sangre siguiendo dos vías diferentes, que incluyen la activación secuencial de varias serín proteasas, por proteólisis limitada de pro-enzimas inactivos que están presentes en el plasma (Fig.1). Las rutas se inician por diferentes mecanismos, pero convergen al nivel de Factor Xa.

El contacto de la sangre con superficies cargadas negativamente y presumiblemente también con estructuras subendoteliales, expuestas por un daño en los vasos sanguíneos, activa la vía intrínseca. Los enzimas coagulantes que se generan como consecuencia de la activación por contacto, antes de la adición de  $\text{CaCl}_2$  en plasma, son el factor XIIa y el factor XIa (Lammle y Griffin, 1985). La adición de calcio a plasma activado por contacto produce la activación de factor IX por el factor XIa. El factor IXa a su vez activa el factor X, en una reacción que requiere factor VIIIa, fosfolípido y calcio.

La liberación celular de factor tisular, o tromboplastina, inicia la vía extrínseca. La interacción, dependiente de calcio, de la tromboplastina tisular con el factor VII, da lugar a la producción del factor VIIa y la subsecuente activación de los factores X y IX (Nemerson, 1966; Zur y Nemerson, 1980; Bach et al., 1981; Morrison y Jesty, 1984; Nemerson, 1988).

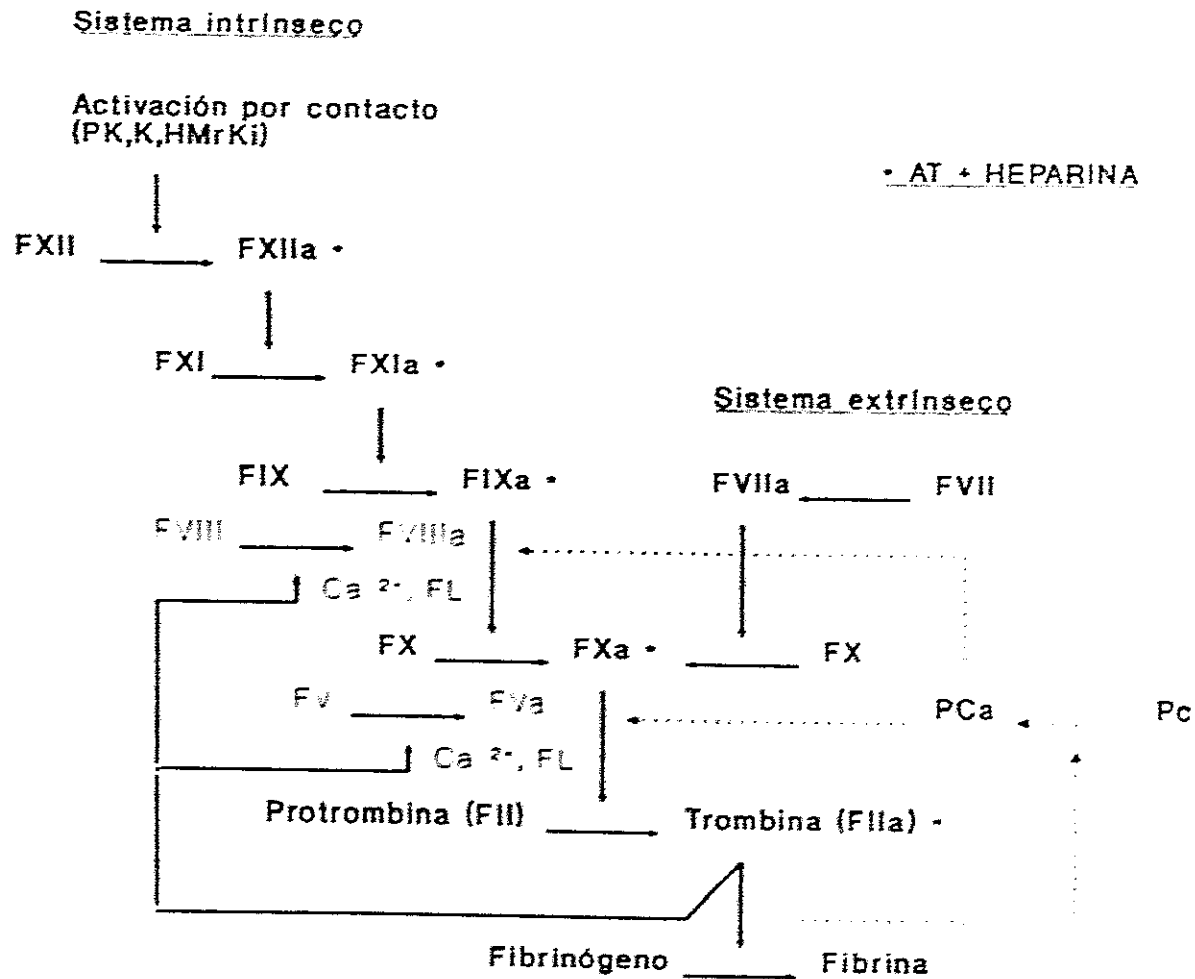


Fig.1. Esquema simplificado de la cascada de la coagulación. Los factores de coagulación se indican con números romanos y el subíndice "a" muestra el factor activado proteolíticamente. Las líneas sólidas representan vías de aceleración de la coagulación y las líneas discontinuas, vías de inhibición de la coagulación. Un asterisco señala los enzimas inactivados por el complejo ATIII-Heparina.

Varios de los pasos en las dos vías descritas, se localizan en la superficie de plaquetas activadas o posiblemente en la de células endoteliales y requieren iones calcio y otros cofactores. El factor Xa, originado por cualquiera de las rutas, se une al factor Va sobre una superficie coagulante en presencia de iones calcio formando el complejo enzimático protrombinasa (Tans y Rosing, 1986), que convertirá protrombina en la proteasa activa: trombina. Esta enzima juega un papel fundamental en la cascada de la coagulación, rompiendo ciertas uniones peptídicas del fibrinógeno (Smith, 1984; Blombäck, 1986) llevando a la formación de un gel de fibrina, que constituye el entramado del coágulo. La regulación del nivel de trombina activa es por consiguiente críticamente importante en hemostasis.

## 1.2 REGULACIÓN DE LA FORMACIÓN DE TROMBINA

Es ya bien conocido que la activación de los factores V y VIII es necesaria para ejercer su papel como cofactores de proteínas y que la trombina es el enzima que da lugar a estas activaciones (Newcombs y Hoshida, 1965; Bergsagel y Nockolds, 1965; Biggs et al., 1965; Suzuki et al., 1982). Entre las diferentes actividades de trombina, dos de éstas son esenciales para provocar la formación explosiva de trombina que se requiere para constituir el tapón hemostático. Se ha demostrado que la trombina es, en plasma, el enzima llave para la activación "feedback" de los cofactores Factor V y Factor VIII (Pieters et al., 1989; Yang et al., 1990; Ofosu et al., 1991). La trombina es además, junto con el colágeno, un potente activador de plaquetas y un fuerte agonista de células endoteliales (Rosing et al., 1985; Laposata et al., 1983). Es decir que la trombina es responsable de la aceleración de su propia generación a través de la activación de los cofactores de proteínas factor VIII:C y factor V y proporciona a su vez una superficie procoagulante debido a la activación de plaquetas.

En individuos sanos el sistema de la coagulación se controla muy eficazmente y, en ausencia de estímulo trombogénico, el sistema se comporta en favor de la regulación negativa del proceso (Bauer y Rosenberg, 1987). Como el proceso hemostático depende de la formación de complejos moleculares constituidos por un zimógeno, un cofactor y un enzima transformante unidos a una superficie, la supresión final del proceso puede alcanzarse inhibiendo los complejos moleculares y la generación de sus componentes. Hasta el momento se han identificado una serie de mecanismos de control, y aunque algunos de ellos no están bien entendidos, básicamente pueden considerarse dos tipos: la destrucción de cofactores y la inhibición de enzimas.

Durante la coagulación *in vivo* la trombina se une a trombosmodulina, una proteína de membrana localizada en la superficie de células endoteliales (Dittman y Majerns, 1990). El complejo trombina-trombosmodulina activa rápidamente la proteína C del plasma. La proteína C activada se une a la proteína S (Jackson y Nemerson, 1980; Esmon, 1983; Dahlbäck, 1991) sobre la superficie, ya sea, de las plaquetas o del endotelio. Estos complejos catalizan la inactivación proteolítica de factor Va y factor VIIIa (Esmon, 1989) y retrasan la coagulación de la sangre. Al encontrarse la trombosmodulina en la superficie del endotelio intacto, este mecanismo puede ayudar a limitar la formación de trombina a las áreas dañadas. Se ha informado asimismo que la proteína C activada puede iniciar la fibrinólisis, que eventualmente llevará a la destrucción del coágulo de fibrina (Sakata et al., 1985).

En los últimos cinco años, se ha identificado también un mecanismo de regulación de la actividad del complejo factor VIIIa/factor tisular (Rapaport, 1989; Harpel, 1987; Rapaport, 1991). El inhibidor de la coagulación via el factor tisular forma, junto al factor Xa originado durante la coagulación, un

complejo cuaternario con factor VIIa y factor tisular, dependiente de calcio. Así, la formación del complejo atrapa la cantidad limitante de factor tisular y evita mayor activación del sistema de la coagulación.

El plasma contiene asimismo un número de inhibidores de proteasas, que inhiben los enzimas del sistema de la coagulación: Antitrombina III (ATIII,AT), que inhibe la mayoría de los enzimas del sistema de la coagulación como son factor XIIa, factor XIa, factor IXa, factor Xa y trombina (Carrell et al., 1987; Broze et al., 1990); el inhibidor de C1 que inhibe calicreína, factor XIIa, factor XIa (Pixley et al., 1985; Shapira et al., 1982); el inhibidor de la  $\alpha$ 1-proteasa que inhibe el factor XIa y el factor Xa (Scott et al., 1982); la  $\alpha$ 2-macroglobulina que inhibe calicreína, factor Xa y trombina, y el cofactor II de heparina que inhibe trombina (Vogel et al., 1979; Tollefsen y Blank, 1981; Fuchs y Pizzo, 1983; Gitel et al., 1984; Fuchs et al., 1984).

Se considera a ATIII el más importante inhibidor de la coagulación, siendo el principal inhibidor de trombina y de factor Xa, cuando estos enzimas se añaden a plasma *in vitro* o se inyectan *in vivo*. Dadas las altas velocidades de inactivación de los enzimas de las últimas fases de la cascada de la coagulación, particularmente trombina y factor Xa, se les puede considerar los principales sustratos de ATIII en sistemas purificados. La observación de que ATIII inactiva el factor Xa unido a plaquetas en menor proporción que el factor Xa libre (Marciniak, 1973; Miletich et al., 1978) indica que el efecto del inhibidor está significativamente disminuido en el sitio del daño vascular, donde tiene lugar la agregación de plaquetas. En su lugar, ATIII puede actuar como un depurador de los enzimas de la coagulación liberados en la circulación y que son por consiguiente potencialmente perjudiciales.

Las observaciones clínicas de que individuos con deficiencia congénita

de ATIII presentan un riesgo incrementado para desarrollar trombosis venosa profunda (TVP) (Egeberg, 1965; Abilgaard, 1981) han dado la evidencia del papel fundamental de ATIII en la regulación de la coagulación de la sangre bajo condiciones fisiológicas. Entre las antiproteasas, ATIII es particularmente importante por el hecho de que su actividad puede ser incrementada por heparinas, lo que constituye la diana sobre la que actúa esta importante familia de drogas antitrombóticas.

### **1.3 EFECTO DE HEPARINA SOBRE LAS REACCIONES ENTRE ATIII Y LAS PROTEASAS DE LA COAGULACIÓN**

La heparina comercial, heparina no fraccionada (HNF), es una mezcla heterogénea de glucosaminoglicanos, derivados de mucosa intestinal, principalmente de origen porcino. Es esencialmente un producto estándar que contiene unidades repetidas del disacárido constituido por ácido urónico (D-glucurónico o L-idurónico) y D-glucosamina, variablemente sulfatados en los grupos amino e hidroxilo (Choay, 1989). Las preparaciones de heparina comercial son multidispersas, con pesos moleculares que oscilan entre 5000 y 30000, con un máximo alrededor de 13000 (Johnson y Mulloy, 1976). Estas propiedades contribuyen a una marcada heterogeneidad del polisacárido.

Se conoce desde antiguo (McLean, 1916) que el glucosaminoglicano sulfatado, heparina, retrasa la coagulación de la sangre. Poco tiempo después del descubrimiento de la heparina se sugirió que el polisacárido requería un cofactor en plasma para su acción (Howell y Holt, 1918; Howell, 1925), y esta propuesta se confirmó por trabajos subsiguientes (Quick, 1938; Brinkhous et al., 1939). La naturaleza del cofactor de heparina permaneció sin embargo desconocida, aunque se hacía cada vez más evidente una estrecha relación entre este factor y el inhibidor de proteasas de plasma, antitrombina

(Monkhouse et al., 1955; Waugh and Fitzgerald, 1956). La evidencia de que las dos actividades son propiedades de una misma proteína fue dada por Abildgaard (1968), quien aisló la antitrombina en una forma pura. La proteína purificada mostraba actividad anti-trombina y actividad de cofactor de heparina. Estudios por Yin et al. (1971 a,b) mostraron que ATIII también inhibía el factor Xa y así apareció el concepto de actividad anti-Xa de heparina. Otros trabajos mostraron que la actividad del cofactor de heparina es dependiente de la unión de heparina a antitrombina, una interacción que lleva a una profunda aceleración de la velocidad normal de inactivación por el inhibidor de la trombina y de otras proteinasas coagulantes (Rosenberg y Damus, 1973).

Hasta 1976, se consideró que en un mayor o menor grado cada molécula de heparina estaba dotada de actividad anticoagulante, y si la actividad biológica estaba ausente, significaba que la sustancia no era heparina. En 1976 sin embargo, tres grupos diferentes de investigadores (Lam et al., 1976; Höök et al., 1976; Andersson et al., 1976) hicieron un descubrimiento fundamental para esclarecer la relación entre la estructura de heparina y su función anticoagulante. Se demostró que únicamente alrededor de un tercio de las moléculas del polisacárido, en las preparaciones de heparina, tenían la capacidad para unirse a antitrombina (fracción de alta afinidad), y que la actividad anticoagulante del material de partida residía principalmente en la fracción unida a antitrombina. Por consiguiente, la unión a ATIII se mostraba como el primer determinante de la actividad anticoagulante de heparina.

La existencia de formas de heparina de alta y baja afinidad implicaba un grado de especificidad de la unión a ATIII desconocido. Poco más tarde Lindahl et al. 1979, utilizando una combinación de despolimerización con ácido



nitroso, cromatografía de afinidad con ATIII y filtración en gel, aislaron un octasacárido que parecía ser el fragmento más pequeño con capacidad de unión a ATIII. Otros estudios de este fragmento revelaron la estructura de un pentasacárido (Fig.2) que resultó ser la secuencia de unión (Casu et al., 1981; Thunberg et al., 1982).

Nuevos estudios de Lindahl et al., 1980, demostraron también la importancia crítica que tenía un grupo sulfato particular, el 3-O-sulfato, sobre el residuo 3, para la unión con ATIII. Este grupo no se encuentra en la heparina de baja afinidad, y su separación del pentasacárido lleva a la total pérdida de la capacidad de unión a ATIII. La estructura y actividad biológica del pentasacárido han sido confirmadas, mediante procesos de síntesis química, por los grupos de Choay, 1983 y Petitou, 1984.

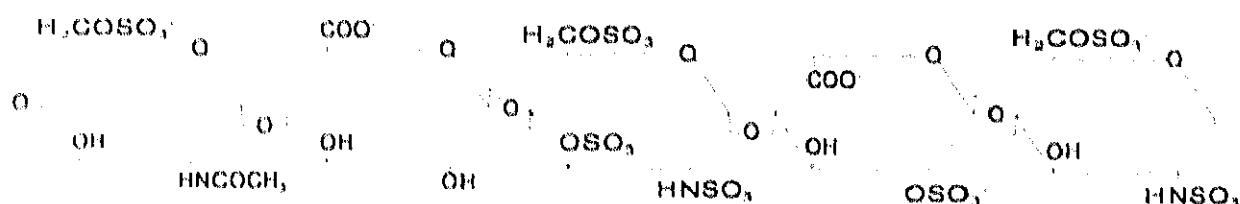


Fig.2. Secuencia del pentasacárido de heparina con alta afinidad por ATIII

Es pues aceptado que cualquier preparación de heparina o fracción de la misma que sea farmacológicamente o clínicamente activa, deberá contener una significativa proporción de moléculas que incorporen la secuencia de unión a ATIII. Se desconoce todavía qué proporción de estas moléculas deben contener.

#### 1.4 RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE DE HEPARINA Y SU PESO MOLECULAR

La unión del pentasacárido a ATIII induce un cambio conformacional que mejora la velocidad de reacción de ATIII con serín proteasas (Einarsson y Andersson, 1977; Olson y Shore, 1981). Puesto que el mecanismo por el que ATIII inhibe serín proteasas es el mismo para todos los enzimas (Björk et al., 1989; Lane y Caso, 1989) sería de esperar que, si la unión a ATIII fuera el único determinante de la actividad anticoagulante, la actividad de las distintas fracciones de peso molecular de heparina sería la misma, independientemente de la enzima o método de ensayo utilizado. Una primera indicación de que éste no era el caso, se demostró en el estudio de una serie de fracciones, preparadas por filtración en gel, que se movían en un rango de peso molecular de 5000 a 30000 aproximadamente (Johnson y Mulloy, 1976). Los dos métodos de ensayo en uso en aquel momento eran APTT y anti-Xa, y éstos dieron resultados completamente diferentes cuando la actividad anticoagulante se representó frente a la masa molecular. En la misma época el componente de alta afinidad de heparina, que había sido preparado por cromatografía de afinidad sobre ATIII inmovilizada, se fraccionó por filtración en gel (Andersson et al., 1976). Las fracciones obtenidas, a la vez que mostraban mayor actividad anticoagulante que las fracciones originales, mostraban exactamente la misma tendencia de dependencia del peso molecular, consistente en una clara disminución de la actividad APTT con el peso molecular, pero aumentando la actividad anti-Xa. Estudios subsiguientes utilizaron ensayos amidolíticos en lugar de métodos de coagulación, confirmando estas tendencias (Barrowcliffe et al., 1978) y se encontró que, utilizando ATIII purificada, la dependencia de la inhibición de trombina del peso molecular era la misma que en el caso de APTT. Es decir que se manifestó claramente que la dependencia de la actividad anticoagulante sobre el peso molecular era

bastante distinta para los dos principales enzimas, trombina y factor Xa, implicando algunas diferencias en el mecanismo de acción. Estos resultados *in vitro*, se encontraron para una variedad de distintas fracciones de heparina (Lane et al., 1978; Barrowcliffe et al., 1979), y las diferencias entre las actividades anti-Xa y APTT se observaron asimismo al inyectar fracciones de heparina de distintos pesos moleculares en voluntarios humanos (Lane et al., 1979; Thomas y Merton, 1982).

## 1.5 HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Como consecuencia de las observaciones indicadas, ha habido un intenso interés en la fabricación de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) para uso clínico (Thomas et al., 1986; Thomas, 1986). Recientemente, la Farmacopea Europea (E.Ph., 1993a) ha publicado una monografía de "Heparina de Bajo Peso Molecular", que define estos preparados como "sales de glucosaminoglicanos sulfatados cuyo peso molecular medio es inferior a 8000, siendo al menos el 60% de las moléculas de peso molecular inferior a 8000". Esta denominación común puede utilizarse para nombrar derivados de heparina muy diferentes, siendo el proceso de fabricación parte de su definición, ya que las actividades fisicoquímicas y biológicas de estos productos así como su perfil clínico pueden depender de estos parámetros.

Para conseguir un rendimiento satisfactorio, la mayoría de los fabricantes han utilizado métodos de despolimerización química o enzimática en la producción de las HBPM, siendo los productos resultantes mezclas de fragmentos oligosacáridos con pesos moleculares medios entre 4000 y 6000, pero incluyendo un amplio rango de pesos moleculares. Algunos de los principales métodos de despolimerización, que se utilizan en la fabricación de las HBPM investigadas en esta memoria se recogen a continuación (tabla 1).

## HBPM COMERCIALES

PRODUCTO	CÓDIGO	FABRICANTE	MÉTODO DE PREPARACIÓN
FRAGMIN	Kabi 2165	KabiVitrum (Suecia)	Ácido nitroso
LOGIPARIN	LHN 1	Novo-Nordisk (Dinamarca)	Heparinasa
FRAXIPARINA	CY216	Choay, Sanofi (Francia)	Ácido nitroso
CLEXANE	PK 10169	Rhône-Poulenc (Francia)	$\beta$ -eliminación

Tabla 1. Métodos de producción y fabricantes de las HBPM comerciales incluidas en esta memoria.

### CLEXANE (CLX)

Clexane (Enoxaparina) es un derivado de heparina obtenido por un proceso de despolimerización química por  $\beta$ -eliminación. El método de fabricación incluye la esterificación de los grupos carboxilo del ácido urónico de la heparina, llevando a la formación de un éster benzílico. Este proceso hace posible una reacción de  $\beta$ -eliminación con la formación de un ácido urónico 4,5 insaturado (Mardiguan, 1981). Como consecuencia de este proceso se obtienen fragmentos de bajo peso molecular de heparina con un doble enlace terminal en su extremo no reductor. Después de la neutralización de la solución, la heparina despolimerizada puede ser aislada y purificada de acuerdo con procedimientos estándar. La preparación es una sal sódica.

En el momento actual, Clexane es la única HBPM obtenida por

despolimerización química que exhibe el doble enlace en los extremos no reductores de los fragmentos. El ácido urónico no saturado presenta una absorción al ultravioleta ( $\lambda$ , 235 nm), que es proporcional al número de cadenas en cualquier muestra dada.

#### FRAGMIN (FRG)

El proceso de fabricación de Fragmin utiliza una despolimerización controlada con ácido nitroso (Cifonelli y King, 1972; Andersson et al., 1981) a partir de heparina sódica derivada de mucosa intestinal porcina. Al proceso de despolimerización le sigue un paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico.

El tratamiento de heparina con ácido nitroso a bajo pH causa la desaminación selectiva de residuos N-glucosamina sulfatados, con la subsecuente reorganización y ruptura de la unión glucosídica entre glucosamina y ácido urónico. Ésto lleva a la formación de oligosacáridos con residuos terminales 2,5 anhidro-D-manosa, en lugar del residuo de glucosamina. Los residuos anhidro-manosa terminales se estabilizan por reducción con borohidrato sódico, con la formación de 2,5 anhidro-D-manitol. La heparina despolimerizada se aísla y purifica por precipitación fraccionada o cromatografía de intercambio iónico.

#### FRAXIPARINA (FRX)

La preparación CY216 desarrollada por el Instituto Choay (Lormeau et al., 1982; Casu et al., 1981) se define por el fabricante como fragmentos de glucosaminoglicanos, obtenidos a partir de heparina sódica porcina por despolimerización controlada con ácido nitroso, reducción y purificación. El

último paso es la conversión de una sal sódica en sal cálcica, siendo la única HBPM convertida a sal cálcica. No se comenta el método de preparación, por ser similar al descrito anteriormente para FRG.

## LOGIPARINA (LOG)

La preparación LHN-1 de Novo-Nordisk se prepara a partir de heparina derivada de mucosa porcina por despolimerización enzimática controlada, utilizando heparinasa de *flavobacterium heparinum*. Este enzima separa específicamente uniones glucosídicas entre los residuos ácido idurónico-2-sulfato y N-glucosamina sulfato, con la formación de oligosacáridos que llevan residuos urónicos 4,5 insaturados en el extremo no reductor (Nielsen y Ostergaard, 1988; Loganathan et al., 1990). Estos residuos presentan, al igual que en el caso de CLX, absorción al ultravioleta ( $\lambda$ , 235 nm).

## 1.6 ACCIONES ANTICOAGULANTES DE LAS HBPM

En el contexto de esta memoria, el término "actividad anticoagulante" se define en su sentido clásico, esto es, cualquier acción que previene o retrasa la coagulación *in vitro*. Puesto que la coagulación solo ocurre en presencia de trombina, "actividad anticoagulante" significa cualquier actividad que aumenta la inhibición de trombina, o inhibe o retrasa o previene la generación de trombina. Para distinguir entre los procesos *in vivo* e *in vitro*, el término "actividad antitrombótica" se referirá exclusivamente a la prevención de coagulación *in vivo*.

### 1.6.1 Inhibición de Trombina y Factor Xa

Se ha indicado ya que el requerimiento mínimo para la unión de heparina

a ATIII es una secuencia de pentasacárido específica, con el consiguiente cambio conformacional que incrementa la actividad del inhibidor. Además, los requerimientos para la potenciación de la actividad inhibitoria de heparina difieren para los varios enzimas de coagulación. Este hecho se observó, de forma muy aparente, cuando se analizaron fragmentos inferiores a 18 sacáridos (PM 5400). Holmer et al., aislaron en 1980 un fragmento que contenía 10 a 16 sacáridos con alta afinidad por ATIII. Este fragmento tenía muy alta actividad anti-Xa pero su actividad en un ensayo de inhibición de trombina fue muy inferior. Posteriormente otros grupos (Thomas et al., 1982; Barrowcliffe et al., 1984) estudiaron tres fragmentos de PM mejor definido: un deca-sacárido, un hexadecasacárido y un fragmento de 20 a 22 sacáridos. Todos los fragmentos tenían actividad anti-Xa pero solamente el fragmento de 20-22 sacáridos presentaba actividad significativa en ensayos de inhibición de trombina. Estos resultados indicaban que un cierto PM era un requerimiento absoluto para la potenciación de la inhibición de trombina. Este requerimiento se definió de forma más precisa por Lane et al. (1984), indicando que la actividad anti-IIa no se encontraba hasta alcanzar una longitud de al menos 18 sacáridos, y que aumentaba de forma importante a partir de este PM. Es decir, la inhibición de trombina requiere una secuencia de polisacárido adicional al pentasacárido, de al menos 13 sacáridos, de forma que ambos, enzima e inhibidor, puedan unirse a la misma cadena de heparina. Esto es el llamado mecanismo "template" (Pomerantz y Owen, 1978). Se ha sugerido que este mecanismo de aproximación es al menos tan importante como el cambio conformacional de ATIII.

Parece evidente, de los estudios ya mencionados, que el mecanismo de potenciación de la inhibición de factor Xa por heparina es distinto del de trombina, ya que los fragmentos de bajo peso molecular con actividad anti-IIa disminuída retienen su actividad anti-Xa. La potenciación de la inhibición de

factor Xa, sin embargo, requiere solamente la secuencia mínima del pentasacárido. No hay requerimiento para la unión del enzima y por ello las moléculas por debajo de los 18 sacáridos, así como el pentasacárido sintético tienen alta actividad anti-Xa (Choay et al., 1983; Thomas et al., 1989a), a pesar de no potenciar la inhibición de trombina por ATIII. Esta diferencia en el mecanismo de acción es responsable de que las HBPM comerciales, constituidas por varias mezclas de moléculas superiores e inferiores a 18 sacáridos, exhiban actividades más elevadas en ensayos anti-Xa que en ensayos anti-IIa.

Existen otros aspectos de la actividad anti-Xa en HBPM que merecen mención. El primero es que la actividad anti-Xa se mide en la mayoría de los sistemas de ensayo utilizando el enzima libre, y en ausencia de calcio. Cuando los ensayos anti-Xa se hacen en plasma, el factor Xa es necesariamente adicionado a plasma heparinizado en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ , ya que el plasma citratado y la adición de  $\text{CaCl}_2$  causarían coagulación. Sin embargo, pueden realizarse ensayos con ATIII, en presencia o ausencia de  $\text{CaCl}_2$ , y esto introduce una diferencia sustancial en cuanto a la dependencia de la actividad anti-Xa del peso molecular. Se encontró que la adición de iones calcio potencia la actividad anti-Xa, aumentando el grado de potenciación con la longitud de la cadena, y dando como resultado un marcado incremento de la actividad específica molar con el peso molecular (Barrowcliffe y Le Shirley, 1989; Ellis et al., 1986). Por consiguiente, la inhibición de factor Xa por ATIII se incrementa a medida que aumenta el peso molecular, cuando se mide con factor Xa humano en presencia de  $\text{CaCl}_2$ . Estos resultados sugieren la posibilidad de un mecanismo "template", con  $\text{CaCl}_2$  promoviendo la unión de factor Xa a heparina, de forma análoga a lo que ocurría en el mecanismo de unión a trombina. Por otro lado, la acción inhibitoria de ATIII sobre factor Xa, en presencia y ausencia de heparina, disminuye marcadamente cuando el



factor Xa forma parte del complejo protrombinasa (Jackson, 1987). En ausencia de heparina, la inhibición de factor Xa por ATIII es mucho más lenta cuando el factor Xa se une a plaquetas (Walsh y Biggs, 1972) o al complejo  $Ca^{2+}$ -Fosfolípido-factor Va (Marciniak, 1973; Nesheim y Mann, 1983). Estudios realizados por Barrowcliffe et al. (1987) y Shoen et al. (1989) mostraron asimismo una disminución de la actividad anti-Xa cuando se medía en esta forma más fisiológica. Estas observaciones sugieren que las altas actividades anti-Xa de los componentes de muy bajo peso molecular de las HBPM, medidas utilizando el enzima libre, pueden exagerar la influencia de estos componentes *in vivo*.

#### 1.6.2 Inhibición de Generación de Trombina

Se ha indicado ya que el objetivo de cualquier anticoagulante es reducir, retrasar o prevenir la generación de trombina. Aunque las acciones inhibitorias de las HBPM sobre serín proteasas individuales son ahora bastante conocidas, la complejidad del sistema de la coagulación hace difícil predecir qué reacciones son más importantes para la inhibición de la generación de trombina. Los estudios con enzimas aislados, incluso si se realizan bajo condiciones fisiológicas, no son necesariamente una buena guía de la capacidad global de heparina y de las HBPM para inhibir la generación de trombina. Una de las principales razones para ello, es la existencia de los "feedback loops" de trombina, por los que las primeras trazas de trombina producidas activan los cofactores VIII y V, dando lugar a un rápido incremento de la generación de trombina subsecuente. Estudios realizados por Ofosu et al. (1987, 1989) y Hemker et al. (1987), han puesto de manifiesto la importancia de la inhibición de estos "feedback loops" de trombina por heparina y HBPM. Las moléculas por debajo de 18 sacáridos, incluyendo un pentasacárido sintético, son inhibidores relativamente débiles de generación

de trombina, a pesar de su elevada actividad anti-Xa, mientras que las cadenas de heparina alrededor de 18 sacáridos son inhibidores de generación de trombina mucho más potentes (Ofosu et al., 1985; Barrowcliffe y Thomas, 1989).

La importancia de la inhibición de trombina se puso de manifiesto asimismo por el hecho de que inhibidores sintéticos de trombina (p.e. hirudina recombinante), que no tienen actividad anti-Xa, son eficaces inhibidores de generación de trombina *in vitro* (Ofosu et al., 1985; Gray et al., 1991).

### 1.6.3 Interacción con proteínas neutralizantes de heparina

Aunque la unión a ATIII es el principal determinante de las actividades anticoagulantes de heparina y HBPM, su acción global *in vivo* puede ser considerablemente afectada por la interacción con otras proteínas del plasma, algunas de las cuales modulan la actividad anticoagulante. La proteína más importante en esta categoría es el factor 4 plaquetario (F4P), que está presente en los granulos  $\alpha$ - de las plaquetas y se libera tras su activación. Existen dos aspectos importantes de la interacción de F4P con heparina que son relevantes para la acción de las HBPM *in vivo*. El primero es que la interacción es dependiente del peso molecular (Lane et al., 1984, 1986) requiriendo una longitud de cadena de al menos 18 sacáridos para su unión óptima. Este es el mismo requerimiento que para la inhibición de trombina, de forma que las moléculas por encima de 18 sacáridos, que tienen actividad anti-Xa y anti-IIa, pueden ser completamente neutralizadas por F4P, mientras que las moléculas inferiores a 18 sacáridos, que retienen actividad anti-Xa, son más resistentes a la neutralización por F4P. Podría esperarse entonces que las HBPM serían más efectivas que HNF como inhibidores de generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP). Por otro lado, F4P interacciona

igualmente bien con heparina de alta y baja afinidad por ATIII. Es decir que a una concentración determinada de F4P, la presencia de moléculas de heparina de baja afinidad protegerán de la neutralización a las moléculas de alta afinidad y esta protección será superior en las preparaciones de heparina con mayor proporción de moléculas de baja afinidad, como es el caso de las HBPM, comparadas con HNF.

## **I.7 ACCIÓN ANTITROMBÓTICA EN MODELOS ANIMALES**

Aunque los datos obtenidos de modelos animales pueden estimarse únicamente como un sustituto de los resultados clínicos, puede extraerse una información útil siempre que el modelo escogido sea relevante del proceso patogénico de trombosis en el hombre, y que se utilicen técnicas bien estandarizadas. La patogénesis de trombosis venosa engloba principalmente hipercoagulabilidad y estasis, teniendo solo un papel menor la activación de plaquetas y el daño de vasos sanguíneos (Thomas, 1988). Uno de los modelos animales más ampliamente utilizado para el estudio de heparina y anticoagulantes similares es el modelo de estasis en conejo, originalmente desarrollado por Wessler (1959, 1962). Como fuente de hipercoagulabilidad en el modelo original se utilizó suero humano, que contenía varios factores de coagulación activados. La combinación de la inyección de suero y estasis venosa local, produce un trombo reproducible que puede utilizarse como base para el estudio de los efectos de varios preparados anticoagulantes.

### **I.7.1 Acción antitrombótica y actividad anti-Xa**

La hipótesis de que la prevención de trombosis por heparina estaba fundamentalmente relacionada con su actividad anti-Xa, se basaba en dos líneas de razonamiento. En primer lugar, el éxito clínico de bajas dosis de

heparina en la prevención de TVP post-cirugía era difícil de explicar, ya que a esas bajas dosis apenas se obtenía prolongación del tiempo de coagulación en ensayos de APTT. En segundo lugar, debido a la naturaleza de amplificación de la cascada de la coagulación, la inhibición de factor Xa podría proveer mayor acción antitrombótica que la propia inhibición de trombina. Los estudios iniciales con fracciones de bajo peso molecular de heparina, apoyaban la hipótesis de que la actividad anti-Xa estaba unida a sus efectos antitrombóticos. Por ejemplo, Thomas et al. (1981), utilizando un modelo Wessler de estasis en conejo, con suero como estímulo, encontraron que una fracción con PM alrededor de 8000 era tan eficaz como HNF, cuando su actividad se expresaba en mg ó en unidades anti-Xa, a pesar de que presentaba únicamente la mitad de la actividad de HNF en ensayos APTT. Holmer et al. (1982), encontraron resultados similares con una fracción de PM alrededor de 4000 que mostraba únicamente el 20 % de la actividad APTT de HNF, y lo mismo ocurrió en otros grupos que utilizaron una variedad de fragmentos de heparina con PM medio de 4000 a 6000 (Bergvist et al., 1985; Diness et al., 1986). No obstante todas estas preparaciones eran heterogéneas y no podía concluirse si la actividad anti-Xa era la única responsable del efecto antitrombótico.

En 1982, aparecieron tres publicaciones que mostraban evidencia de la hipótesis opuesta. Holmer et al. (1982), utilizando fragmentos de PM 2100, 3300 y 4000, encontraron que los fragmentos de peso molecular más pequeño, que tenían elevada actividad anti-Xa y casi ningún efecto sobre el ensayo APTT, eran pobres agentes antitrombóticos. Thomas et al. (1982), mostraron que un decasacárido homogéneo con alta afinidad por ATIII, apenas presentaba acción antitrombótica, a pesar de tener una actividad anti-Xa superior a 1000 UI/mg. Un fragmento mayor de 16 sacáridos fue más efectivo pero solo la mitad de activo que HNF, como lo era un fragmento de 20-22

sacáridos. Una discordancia similar entre actividad anti-Xa y acción antitrombótica se informó por Ockelford et al. (1982), para un fragmento de PM 3000. Igualmente, Mattson et al. (1989) encontraron una gradual disminución de potencia antitrombótica, al valorar oligosacáridos individuales de 8 a 20 unidades en un modelo de estasis en conejo, a medida que disminuía la longitud de la cadena. Es decir, la correlación entre actividad antitrombótica y actividad anti-Xa se rompe por debajo de 18 sacáridos y por ello en este rango, el peso molecular parece ser el más importante parámetro de la acción antitrombótica.

Una razón de la pobre correlación con la actividad anti-Xa para un muy bajo peso molecular, puede ser el método de medida de actividad anti-Xa ya comentado, en el que se utiliza factor Xa libre en ausencia de iones calcio u otros componentes del complejo protrombinasa. Esto puede ayudar a explicar la disminución gradual en actividad antitrombótica, encontrada por Mattson, al disminuir el peso molecular.

### 1.7.2 Acción antitrombótica y actividad anti-IIa

La importancia de los "feedback loops" de trombina y la relativa ineficacia como inhibidores de generación de trombina de oligosacáridos con actividad anti-Xa únicamente, ha subrayado que la potenciación de la inhibición de trombina por heparina y las HBPM es el parámetro más relevante para su capacidad global de inhibición de generación de trombina. Puesto que los oligosacáridos inferiores a 18 unidades, que no presentan actividad anti-IIa, son también agentes antitrombóticos menos eficaces que las moléculas más grandes, la cuestión a plantear es si la actividad anti-IIa de estas cadenas más largas es importante para su acción antitrombótica. Esta hipótesis es difícil de valorar con heparina y HBPM ya que no existen cadenas de sacáridos que

presenten actividad anti-IIa sin tener también actividad anti-Xa. No obstante, Ofosu et al. (1988), mostraron que los polisacáridos sulfatados dermatán sulfato y pentosán sulfato, que no tienen actividad anti-Xa pero catalizan la inhibición de trombina via el cofactor II de heparina, eran agentes antitrombóticos eficaces si se administraban en dosis elevadas. Estos estudios demostraban que preparaciones que inhiben únicamente trombina pueden ser eficaces agentes antitrombóticos, aunque a mayores dosis que HNF, y que un relativamente modesto incremento en la capacidad de los plasmas para inhibir trombina, que no puede detectarse por ensayos de anticoagulación convencionales, podría ser suficiente para dar un efecto antitrombótico, al menos en el modelo animal estudiado. Por último, nuevo soporte del papel de la inhibición de trombina en la acción antitrombótica *in vivo* se ha aportado por el grupo de Amar et al. (1990), utilizando tromboplastina como estímulo trombogénico, al encontrar una buena correlación entre las actividades antitrombótica y anti-IIa de HNF y dos HBPM.

## **1.8 RELEVANCIA CLÍNICA DE LAS ACTIVIDADES ANTI-Xa Y ANTI-IIa**

En el marco de la profilaxis de TVP, que es la principal indicación de las HBPM, la tabla 2 recoge un resumen de las dosificaciones de las varias HBPM utilizadas en clínica (información dada por los fabricantes). Puede observarse que las actividades anti-Xa de las distintas HBPM cubren un rango reducido, de 2000 a 3500 UI, mientras que las actividades anti-IIa de las mismas preparaciones cubren un rango de factor 5. En la situación clínica referida, parece existir una mejor correlación de la dosis eficaz con la actividad anti-Xa, que con la actividad anti-IIa. La explicación no obstante se complica por el hecho de que estas preparaciones se administran subcutáneamente, y las diferencias en absorción de las moléculas con actividades anti-Xa y anti-IIa podrían tener un papel importante. En el tratamiento de trombosis venosa

existen pocos estudios de HBPM bien controlados, que hayan sido publicados hasta el momento (Albada et al., 1989; Hull et al., 1992; Hull y Pineo, 1992), y existe de nuevo una buena correlación entre la actividad anti-Xa y efectos clínicos.

#### PROFILAXIS DE TVP

	mg	aXa (UI)	alla (UI)
FRAGMIN	R 18	2500	1100
LOGIPARIN	R 45	3500	2400
FRAXIPARIN	R 32	3100	860
CLEXANE	R 20	2000	500

Tabla 2. Dosis de las distintas HBPM comerciales utilizadas en profilaxis de TVP, expresadas en términos de peso, actividad anti-Xa y actividad anti-IIa.

Globalmente, puede decirse que los resultados clínicos no apoyan la hipótesis de que la actividad anti-IIa de las HBPM sea más importante que su actividad anti-Xa en la acción antitrombótica *in vivo*. Una posible explicación es que en todos estos ensayos clínicos, la actividad anti-Xa fuera solo un marcador de la actividad biológica real, esto es de la inhibición de los "feedback loops" de trombina. En cualquier caso la actividad anti-Xa es probablemente el mejor indicador de los sitios de unión a ATIII, prerrequisito de la actividad antitrombótica. En este sentido, el Profesor Ofosu sugirió que los ensayos anti-IIa son insuficientemente sensibles y observó (Ofosu et al., 1988) que la inhibición de trombina adicionada a plasma no diluido se correlacionaba con la actividad antitrombótica en animales.

Otra posible explicación para la pobre correlación de ensayos anti-IIa con la situación *in vivo*, enunciada por el profesor Hemker (1987), es que las

actividades relativas de HBPM y HNF pudieran ser diferentes en presencia de F4P, por su menor neutralización de HBPM que de HNF.

Los estudios recogidos en esta Introducción constituyen el límite del conocimiento sobre los mecanismos de acción de las HBPM, *in vivo*. A pesar de importantes investigaciones durante las últimas dos décadas, la acción terapéutica de heparina no está bien entendida y es en el marco de estos antecedentes en el que se inició la investigación descrita en esta memoria.



## II. OBJETIVOS

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La heparina de bajo peso molecular (HBPM) está demostrando ser una alternativa bien establecida frente a la heparina no fraccionada (HNF), particularmente en la profilaxis de trombosis venosa profunda (TVP), donde la conveniencia de una única inyección diaria, en lugar de dos o tres como para HNF, constituye una ventaja definitiva. Sin embargo existe todavía una importante controversia sobre los mecanismos de su efecto antitrombótico *in vivo*, y en particular acerca de la relevancia de los varios ensayos y actividades anticoagulantes *in vitro* con respecto a sus acciones *in vivo*.

Esta memoria, después de haber revisado de forma detallada la situación de esta controversia (ver Introducción), estudiará principalmente la relación entre las actividades antitrombóticas de 4 HBPM comerciales (FRG, LOG, FRX, CLX) determinadas en un modelo animal y sus actividades anticoagulantes medidas *in vitro*, siempre en comparación con su precursor HNF.

Se recogen a continuación los objetivos desarrollados a lo largo de esta investigación:

1. Determinar la capacidad de distintas HBPM y de HNF para inhibir la generación de trombina en plasma pobre en plaquetas (PPP) y evaluar la relación de estas actividades con las obtenidas en ensayos amidolíticos convencionales de actividad anti-IIa y actividad anti-Xa.

2. Estudiar el efecto del Factor 4 Plaquetario (F4P) purificado sobre las actividades de HNF y de las HBPM en los sistemas de ensayo de actividad anti-Xa y actividad anti-IIa por sustratos cromogénicos, y de generación de trombina en PPP.

3. Medir las actividades inhibitorias de HNF y las distintas HBPM en el ensayo de generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP), y analizar el significado de estas actividades en relación a las encontradas en PPP y en PPP + F4P.

4. Investigar la capacidad de HNF y de las HBPM para prevenir la formación del trombo en un modelo de estasis venosa de Wessler en conejo, utilizando suero humano como estímulo trombogénico.

5. Elucidar la correlación entre la eficacia antitrombótica *in vivo* y las actividades anticoagulantes *in vitro* de las distintas HBPM y de HNF. Los ensayos *in vitro* valorados corresponden a los ensayos de generación de trombina, en presencia y ausencia de plaquetas, y a los ensayos de sustratos cromogénicos anti-Xa y anti-IIa.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

## III.1 MATERIALES

### III.1.1 Patrones

#### III.1.1.1 4º Patrón Internacional de HNF [HNF(PI)]

Liofilizado de heparina sódica, extraída de mucosa intestinal porcina, envasado en ampollas; peso medio del liofilizado 9.2 mg. La potencia estimada, 1780 UI por ampolla, se valoró en un estudio de colaboración internacional (Thomas et al., 1984).

Este patrón se estableció en 1983 por el Comité de Expertos de Estandarización Biológica (CEEB), de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La preparación se distribuye por el NIBSC (código 82/502), Potters Bar, Herts EN6 3QG, acompañada de información adicional sobre la reconstitución y mantenimiento del patrón.

#### III.1.1.2 1º Patrón Internacional de HBPM [HBPM(PI)]

Preparación de heparina de bajo peso molecular (sal sódica), envasada y liofilizada en ampollas; peso medio del liofilizado 10 mg. El principio activo se preparó a partir de heparina sódica no fraccionada, procedente de mucosa porcina, por despolimerización controlada con ácido nitroso y reducción por borohidrato sódico. El 90% de los polisacáridos de esta preparación se mueve en un rango de masa molecular de 2000 a 9000 Da, siendo su masa molecular media alrededor de 5000 Da.

La preparación se calibró en un estudio de colaboración internacional (Barrowcliffe et al., 1988), asignándose las siguientes potencias:

- 1680 UI de actividad anti-factor Xa por ampolla
- 665 UI de actividad inhibitoria de trombina por ampolla

El valor de potencia anti-factor Xa se utilizará siempre que se realicen ensayos de coagulación o amidolíticos para medir esta actividad, ya sea en plasma, o en un sistema purificado con ATIII. El valor de la actividad inhibitoria de trombina se utilizará como referencia cuando esta actividad se mida en cualquiera de los sistemas de APTT, tiempo de trombina o inhibición de trombina en ensayos amidolíticos.

Este patrón se estableció por el CEEB de la OMS en 1986. Se distribuye igualmente por el NIBSC, código 85/600, con información adicional sobre el uso de la preparación.

#### **III.1.1.3 1º Patrón Internacional de Trombina Humana**

Extracto de fracción III de Cohn obtenida a partir de una mezcla de plasma humano, siguiendo el método de Miller y Copeland (1962), con un contenido de 100 UI de trombina por ampolla. Consiste principalmente de  $\alpha$ -trombina, con alta proporción de  $\beta$  y  $\gamma$ -trombinas.

Este patrón se estableció en 1975 sobre la base de un estudio de colaboración internacional (Robertson et al., 1975). El Comité Internacional de Trombosis y Hemostasis recomendó su adopción y la unidad que define. Una unidad NIH (National Institute of Health, U.S.A) es comparable a una unidad internacional de este patrón. Se distribuye por el NIBSC con el código 70/157.

#### **III.1.1.4 1º Patrón Internacional de $\alpha$ -Trombina Humana**

Preparación liofilizada de  $\alpha$ -trombina de alta pureza, obtenida a partir de

la fracción III de Cohn, según el procedimiento de Fenton et al. (1977). En un estudio de colaboración internacional (Gaffney et al., 1992), se le asignó una potencia de 100 UI por ampolla.

Esta preparación se estableció como patrón internacional por el CEEB, OMS, en 1991. Las ampollas se distribuyen por el NIBSC, código 89/588, con información adicional sobre las características e instrucciones de uso de este material.

#### **III.1.1.5 1<sup>o</sup> Patrón Internacional de F4P Humano Purificado**

Liofilizado de F4P disuelto en NaCl 0.6M Tris 10 mM, pH 8.2, con 2 mg/ml de albúmina humana como estabilizador, y envasado en ampollas (Campbell, 1974). Esta preparación se valoró por radioinmunoensayo (RIA), en un estudio de colaboración internacional (Curtis y Kerry, 1983) y la estimación del contenido de F4P fue de 382 ng/ampolla.

El patrón (NIBSC código 83/505) se estableció por la OMS (CEEB) en 1984 y está actualmente extinguido. Las ampollas se almacenaron a -40°C.

#### **III.1.1.6 Calibrador de Peso Molecular para HBPM**

Muestra de heparina procedente de mucosa bovina, parcialmente degradada por heparinasa. Cubre un rango de masa molecular de 600 Da a aproximadamente 10 kDa. La preparación se presenta en ampollas, que contienen  $21.48 \pm 0.15$  mg del calibrador, almacenadas a -20°C. Se estableció en 1991 por el Comité Científico de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia. Se distribuye por el NIBSC con el código 90/686.

### **III.1.2 HBPM Comerciales**

#### **III.1.2.1 Fragmin (FRG)**

Jeringas prellenadas, 5000 UI anti-Factor Xa en 0.2 ml; concentración (p/v) 170 mg/ml. Lotes 42409 y 45331. KabiVitrum AB, Sweden.

#### **III.1.2.2 Logiparin (LOG)**

Jeringas prellenadas, 3500 UI anti-Factor Xa en 0.3 ml; concentración (p/v) 140 mg/ml. Lote 220690. Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark.

#### **III.1.2.3 Fraxiparina (FRX)**

Jeringas prellenadas, 3100 UI anti-Factor Xa en 0.3 ml; concentración (p/v) 100 mg/ml. Lote C1. Labaz, Sanofi, Barcelona, España.

#### **III.1.2.4 Clexane (CLX)**

Jeringas prellenadas, 4000 UI anti-Factor Xa en 0.4 ml; concentración (p/v) 100 mg/ml. Lotes 4221 y 4253. Rhône Poulenc Rorer, France.

### **III.1.3 Reactivos**

#### **III.1.3.1 Plasma Humano Normal**

##### Plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se preparó a partir de sangre fresca de 6 donadores, recogida en CPD



(Citrato-Fosfato-Dextrosa) - Adenina. A fin de obtener la máxima separación de células, se realizó una doble centrifugación de las seis unidades de plasma fresco, a 20000 rpm durante 45 minutos, y el plasma lipémico fue descartado ya que reduce la sensibilidad a la heparina.

El plasma obtenido se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 5-7 ml en tubos de plástico, congelado rápidamente y almacenado a -40°C o inferior durante un período máximo de 6 meses. En el curso de la investigación, se utilizaron tres lotes diferentes de PPP identificados con la fecha de mezcla: 31/7, 13/11, 15/1.

#### Plasma rico en plaquetas (PRP)

Obtenido a partir de sangre fresca de donadores individuales en ayunas, recogida en citrato trisódico 3.8% (1 volumen/9 volúmenes de sangre). La muestra de sangre fue decantada cuidadosamente desde la jeringa por la pared del tubo de plástico y mezclada suavemente dos o tres veces con el anticoagulante. La centrifugación se realizó a 1100 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente, sin freno de parada. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento usual de 30 a 35%. Cuando este rendimiento no se consigue, puede volverse a centrifugar a 1100 rpm otros cinco minutos. Un tiempo mayor no es conveniente ya que en la parte superior del sobrenadante aparece PPP. En la preparación del PRP se utilizaron tubos y pipetas de plástico para minimizar la activación por contacto.

#### **III.1.3.2 Suero Humano Normal**

Se prepararon dos lotes diferentes. Para cada lote se recogieron 25 ml de sangre por venipuntura primaria, de cada uno de 20 y 25 donadores sanos

respectivamente, varones y hembras en ambos casos. La sangre, recién extraída se activó con 2 mg /ml de caolín, en frascos universales de vidrio, durante tres horas a 37 °C y se dejó durante toda la noche a 4 °C. La sangre coagulada se separó por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min, extrayéndose el suero que se repartió en alícuotas y se almacenó a -40 °C. Este suero se utilizó como estímulo trombogénico *in vivo*, a la concentración de 1.32 ml de suero por kilo de peso de conejo.

Se realizó un control de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), (enzimoinmunoensayo Abbott, Rec.VIH 1 y 2), sobre los dos lotes de suero, resultando en ambos casos negativo.

#### III.1.3.3 Fibrinógeno Bovino

Fibrinógeno Bovino Diagen, viales liofilizados de 24 mg. Lotes FN 119 y FN 121, Diagnostic Reagents Ltd., Reino Unido.

#### III.1.3.4 Fosfolípido de Cerebro Bovino

Preparado en el NIBSC, código 86/516, a partir de cerebro bovino por un método que minimiza su degradación oxidativa (Barrowcliffe et al., 1982). Contenido: 9.88 mg/ampolla. Cada ampolla se reconstituyó con 1 ml de agua destilada y su contenido se distribuyó en alícuotas de 25 o 50  $\mu$ l en tubos de plástico, que se almacenaron a -40 °C o inferior.

#### III.1.3.5 Arvin (Ancrod)

Ampollas topacio con 1 ml (70 UI) de una solución altamente purificada de ancrod, enzima del veneno de *Agkistrodon rhodostoma*. Fabricante: Knoll

AG Laboratories, West Germany. El contenido de las ampollas se distribuyó en alícuotas de 25  $\mu$ l o 50  $\mu$ l, en tubos Eppendorf, que se mantuvieron congeladas a -40°C.

#### **III.1.3.6 Control de trombocitos CTC-3**

Constituido por trombocitos de origen animal estabilizados y suspendidos en un medio bacteriostático isotónico semejante al plasma. El control CTC-3 es suministrado por Coulter Electronics Ltd., Reino Unido.

#### **III.1.3.7 ATIII Humana**

Concentrado de ATIII envasado y liofilizado por el NIBSC en ampollas (Campbell, 1974), con un contenido de 5 UI/ampolla, estabilizado con Manitol (10 mg/ml) o Trehalosa (10 mg/ml): códigos 87/742 y 87/744 respectivamente. El concentrado de ATIII, con una actividad específica de 4.2 UI/mg, se fraccionó en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Lille (Francia) a partir de plasma humano normal.

#### **III.1.3.8 Trombina Humana**

Alícuotas con 100 UI (20  $\mu$ l) de trombina, congeladas a -80°C. El lote de concentrado de trombina de alta pureza (TH 0015), actividad específica 1700 UI/mg, se fraccionó a partir de plasma humano normal en el Blood Products Laboratory (BPL), Elstree, Reino Unido.

#### **III.1.3.9 Factor Xa Bovino**

Viales liofilizados de Factor Xa cromatografiado Diagen, 4-6

unidades/vial, estandarizado frente a la referencia 75/590 del ICTH (Comité Internacional de Trombosis y Hemostasis), 1 unidad = 12.60 nM. Se utilizó un único lote, XA55, para todos los experimentos. Los viales se almacenaron a -40°C hasta su uso. Diagnostic Reagents Ltd, Oxon, Reino Unido.

#### III.1.3.10 Factor Xa Humano

Alícuotas con 10  $\mu$ l de una solución de 0.56 mg/ml de factor Xa humano, obtenidas por donación del Dr. Oforu, Mc Master University Health Sciences Centre, Ontario, Canada. Las alícuotas se almacenaron a -80°C.

La solución de Factor Xa se preparó por activación RVV (Russell's Viper Venom) del factor X humano y fraccionamiento subsecuente sobre una columna Mono-Q. El factor Xa se eluyó en un tampón conteniendo acetato sódico 20 mM, pH 7, a una concentración de 300 mM de NaCl.

#### III.1.3.11 F4P Purificado Humano

##### Preparación NIBSC 82/648

El contenido asumido por ampolla liofilizada, 500 ng de F4P, se basó en la información obtenida del protocolo utilizado en el estudio de colaboración internacional (sin publicar) para establecer el patrón de F4P purificado humano. Se desconocen más detalles de esta preparación. Las ampollas se almacenaron a -40°C.

##### Reactivo de F4P [F4P(R)]

Preparación desecada, cedida por el Dr. Duncan S. Pepper del National

Science Laboratory, Scottish National Blood Transfusion Service (SNBTS), Edinburgh, Reino Unido. El método de aislamiento de F4P se ha descrito por Moore et al., 1975 y la concentración se midió como peso seco de material. Se recibieron dos envíos de 13 mg cada uno, que se trataron como dos lotes diferentes.

### III.1.3.12 Otros Reactivos

Albúmina Bovina: Polvo de fracción V desecado (humedad 1%), de pureza 98 %. Sigma Chemical Co. St Louis, USA.

Sustratos Cromogénicos: Sustratos Kabi, S-2238 25 mg y S-2765 25 mg, Chromogenix Quadratech, Surrey, Reino Unido.

Cloruro Sódico, NaCl: Pureza 99.9 %. Reactivo analítico Fisons, FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Reino Unido.

Ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH: Ácido acético glacial. Reactivo calidad analítica. Fison Ltd., Loughborough, Reino Unido.

Isoton II: Diluyente utilizado en el Contador Coulter. Distribuido por Coulter Electronics Ltd., Luton, Reino Unido.

Acetato Amónico: Pureza 99%, Analar. Distribuido por BDH Ltd, Poole, Reino Unido.

Imidazol Salino: Pureza 99%, Fisons Analytical Reagent, FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Reino Unido.

Pentobarbital Sódico: Sagatal, 60mg/ml. RMB Animal Health Ltd, Dagenham, Reino Unido.

Solución de Cloruro Cálcico, (CaCl<sub>2</sub>), 1M: Solución volumétrica de 219.08 g de CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Analar. BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido.

Hidroxianisol Butilado (BHA; 2, [3]-tert-butyl-4-hydroxyanisole): Agente antioxidante, Analar. BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido.

EDTA, 2 H<sub>2</sub>O [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>COONa]<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, Analar. Distribuido por BDH Ltd, Poole, Reino Unido.

Tris - (hidroximetil) aminometano, NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, (Tampón Tris): Pureza 99.6 %. Fisons Analytical Reagent, FSA Laboratory Supplies, Loughborough, Reino Unido.

Citrato Trisódico, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>. 2H<sub>2</sub>O: Pureza 99 %, Analar. Distribuido por BDH Ltd., Poole, Reino Unido.

Caolín: Distribuido por BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido.

### III.1.4 Tampones y Diluyentes

#### III.1.4.1 Solución Salina Normal (SS)

Solución de cloruro sódico al 0.85%. Se preparó en agua de calidad Milli Q.

#### III.1.4.2 Tampón Tris Salino (TTS), pH 7.4

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
Tris 50 mM	6.06
NaCl 150 mM	8.77

Agua calidad Milli Q: c.s.p. 1 litro

Ajuste de pH: ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

#### III.1.4.3 Tampón Tris Salino Albúmina 1% (TTS Albúmina 1%), pH 7.4

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
Tris 50 mM	6.06
NaCl 150 mM	8.77
Albúmina Bovina	10

Agua calidad Milli Q: c.s.p. 1 litro

Ajuste de pH: HCl concentrado, antes de la adición de albúmina.

#### III.1.4.4 Tampón Tris Salino Albúmina 1 %, 40 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4

Para preparar 1 litro de este tampón, 40 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1M se adicionaron a 960 ml de TTS albúmina 1%.

#### III.1.4.5 Tampón Citrato-Albúmina-Glyoxalino (CAG), pH7.4

<u>Composición</u>	<u>Volúmenes</u>
Citrato Trisódico 3.8%	30 ml
Albúmina 20%	1 ml
Imidazol 50 mM	150 ml
NaCl 100 mM	

#### III.1.4.6 Tampón Tris EDTA, pH 8.4

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
Tris 50 mM	6.06
NaCl 175 mM	10.23
Na <sub>2</sub> EDTA 7.5 mM	2.79

Agua calidad Milli Q: c.s.p. 1 litro

Ajuste de pH: HCl concentrado.

#### III.1.4.7 Tampón Tris EDTA Albúmina 1%, pH 8.4

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
Tris 50 mM	6.06
NaCl 175 mM	10.23
Na <sub>2</sub> EDTA 7.5 mM	2.79
Albúmina Bovina	10

Agua calidad Milli Q: c.s.p. 1 litro

Ajuste de pH: HCl concentrado, antes de la adición de albúmina

#### III.1.4.8 Solución de Acetato Amónico 0.1 M

Se pesaron 7.71 g para preparar 1 litro de esta solución en agua de calidad Milli Q.

#### III.1.4.9 Soluciones de Cloruro Cálcico 3mM y 25mM

La solución de CaCl<sub>2</sub> 25 mM se preparó a partir de la solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M, por dilución 1/40 en agua de calidad Milli Q. La solución de CaCl<sub>2</sub> 3 mM se obtuvo por dilución de la solución 25 mM, igualmente en agua ultrapura.



#### III.1.4.10 Diluyente de F4P

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
Tris 50 mM	6.06
NaCl 2 M	117

Ajuste de pH: HCl concentrado.

#### III.1.4.11 Diluyente de Fosfolípido

<u>Composición</u>	<u>g/litro</u>
NaCl 150 mM	8.77
BHA 100 mM	18

#### III.1.4.12 Suspensión de Caolín

Se prepararon suspensiones frescas de caolín en solución salina o TTS, a la concentración de 5 mg/ml.

#### III.1.4.13 Solución de Ácido Acético 10%

Ácido acético glacial diluído al 10% en agua calidad Milli Q.

De manera general, en la preparación de todos los reactivos se empleó agua calidad ultrapura, obtenida en el momento de ser utilizada a partir de un equipo Milli Q de la firma Millipore.

#### III.1.5 Instrumental

Analizador microcentrífugo automatizado ACL 300 Research: realiza un

amplio rango de ensayos, empleando ya sea una medida del coágulo por nefelometría o una medida de reacciones cromogénicas mediante un detector óptico que lee a 405 nm. Instrumentation Laboratory Ltd, Warrington, Cheshire, Reino Unido.

Baño de agua circulante termostatzado, rango 0 a 150°C. Grant Instruments Ltd, Cambridge, Reino Unido.

Centrífuga de mesa Beckman TJ-6 con Rotor TH-4 capaz de transportar cuatro gradillas basculantes para dieciocho tubos. Beckman Instruments

Centrífuga refrigerada de alta velocidad Sorvall, RC-5B, con un rotor de ángulo fijo SS-34 que permite una velocidad máxima de operación de 20000 rpm. DuPont Instruments, Newton, CONN, USA.

Coagulómetros de cuatro canales independientes, Schnitger and Gross modelo 410 A 4B. Heinrich Amelung KG, Reino Unido.

Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, System Gold Beckman, Beckman Instruments, que incluye: Módulo de Solventes Programable 126, de doble bomba; Módulo Detector Programable 166, y Válvula de Inyección Modelo 210 A. Todos los módulos se controlaron a partir de un ordenador personal Tandon Plus de 40 M, con el Software de Cromatografía System Gold.

Detector de índice de refracción, Modelo Refractomonitor IV, Ldc Analytical.

Software PL Caliber™ GPC/SEC, con unidad de captura de datos de dos

canales totalmente independientes, PL-DCU, Polymer Laboratories, acoplados a un ordenador personal APPEND 486, 4 Mb RAM y disco duro 120 Mb.

Impresora de chorro de tinta Deskject 510 de Hewlett Packard.

Balanza de precisión Mettler, Modelo AE 160, con un campo de pesada de 0 a 162 gramos y una precisión de 0.1 mg.

pH-metro Beckman, Modelo Century SS-1, con escala expandida y provisto de electrodo de referencia de calomelanos.

Contador de plaquetas Coulter, modelo ZM, con tubo de 70  $\mu\text{m}$  de apertura. Coulter Electronics Ltd., Luton, Reino Unido.

### III.1.6 Material Biológico

#### Animales

Se utilizaron conejos blancos New Zealand, 2-3 Kg, libres de gérmenes patógenos, machos y hembras distribuidos en igual proporción. Regal Rabbits, Surrey, Reino Unido. Cada lote de conejos se mantuvo una semana en cuarentena con dieta de mantenimiento y bebida libre, en condiciones de temperatura controlada de 20-22 °C y ciclo de luz de 12 horas. Dos veces por semana se procedía a la limpieza de jaulas y cambio de comida y bebida.

### III.1.7 Otros Materiales

Tubos de vidrio de 10 ml para coagulómetro. Burkard Scientific, Uxbridge, Reino Unido.

Tubos de plástico desechables de 3, 7 y 10 ml con tapón de plástico y tubos Eppendorf de 100  $\mu$ l. Anglian Lab Products, Kent, Reino Unido.

Vasos de precipitados, matraces erlenmeyer, embudos y probetas de distinta capacidad. Pyrex.

Pipetas automáticas Pipetman de alta exactitud y precisión, modelos P 20, P 100, P 200, P 1000 y P 5000, que cubren el rango de volúmenes de 10  $\mu$ l a 5 ml. Puntas Gilson C 20 (amarillas) para pipetas P20, P100 y P200; C 200 (azules) para pipetas P1000 y C 5000 (blancas) para pipetas P5000. Para obtener volúmenes de 10  $\mu$ l o inferiores, en particular para líquidos de alta densidad, se utilizó una pipeta de desplazamiento positivo Microman con sus puntas correspondientes. Gilson Medical Electronics, France.

Pipetas graduadas y de doble aforo de 5 y 10 ml. Blau Brand.

Placas Petri de plástico desechables, de 5 cm de diámetro. Bibby Sterilin Ltd., Staffs, Reino Unido.

Columnas de HPSEC, TSK G2000SWXL y TSK G3000SWXL, ambas de dimensiones 7.8 x 300 mm y tamaño de poro 5  $\mu$ m. Tosoh Corporation, Japan.

Cronómetros de laboratorio. Gama 1/5, modelo 3131, Suiza.

Equipos para venoclisis estériles y apirógenos de un solo uso, con agujas de 19.1 x 0.8 x 0.6 mm (Butterfly-21); 19.1 x 0.6 x 0.4 mm (Butterfly-23) y 22.2 x 1.1 x 0.8 mm (Butterfly 19). Venisystems, Abbott Ireland Ltd, Sligo, Ireland.

Hilo de seda de sutura negro, en carrete US 5/0. Pearsalls Sutures, Reino Unido.

Toallitas de gasa: 7.5 cm x 7.5 cm, de ocho hilos. Vernon - Carns Ltd., Preston, Reino Unido.

Material de disección: el equipo utilizado se obtuvo de John Weiss & Son Ltd, London, Reino Unido. Se detalla a continuación el tipo de material utilizado:

- Pinzas hemostáticas, de acción cruzada, ligeras y curvas (Ref. B950B)
- Pinzas hemostáticas de mosquito de Halstead, curvas (Ref. B981C)
- Tijeras curvas de punta roma
- Tijeras planas de punta afilada
- Tijeras de excisión C.O.F., curvas, 15 mm longitud de corte (B1012)
- Tijeras planas tipo strabismus, punta curva, 14 mm de corte (B1066C)
- Cuchillas desechables de bisturí y portacuchillas (Ref. Paragon 4)

## III.2 MÉTODOS

### III.2.1 Cromatografía de Exclusion Molecular de Alta Eficacia (HPSEC): Distribución de la Masa Molecular de HBPM

El principio del procedimiento fue propuesto por Nielsen (Van Dedem y Nielsen, 1991; Nielsen, 1992) y está basado en el hecho de que la relación entre la absorbancia al UV, a 235 nm ó 254 nm, y la respuesta del índice de refracción de la heparina degradada por heparinasa, está linealmente correlacionada con el grado de polimerización, esto es, con el número de disacáridos por cadena de dicha heparina.

En este sentido, el establecer un modelo de elución de una HBPM utilizando ambos niveles de detección, absorbancia e índice de refracción simultáneamente, permite calcular la curva de calibración del sistema. Obtenida la curva de calibración, es suficiente utilizar la detección del índice de refracción para determinar la distribución del tamaño molecular de heparinas desconocidas.

#### **Instrumental**

##### **- Sistema cromatográfico**

Se utilizó un equipo de HPLC System Gold, al que se conectó un detector de índice de refracción, en serie. Puesto que los detectores de índice de refracción son sensibles a la presión, el detector de índice de refracción se colocó después del detector UV. Todos los módulos se controlaron desde un ordenador personal, mediante el Software de cromatografía System Gold.

La recogida de datos de los índices de absorbancia y de refracción y su integración, se realizó con ayuda del Software PL Caliber™ GPC/SEC, a través de una unidad de obtención de datos, PL-DCU de dos canales totalmente independientes, acoplada a un ordenador personal.

#### - Columnas

Las columnas de HPSEC se escogieron para resolver en distintos picos los oligosacáridos de menor peso molecular en las muestras. Se utilizó una combinación de dos columnas, conectadas en serie.

#### Reactivos

##### - Tampón de elución

Se utilizó un eluyente de acetato amónico 0.1 M. Se requirió una fuerza iónica elevada con el fin de evitar interacciones entre la columna y las muestras de heparina.

##### - Patrón de calibración

Muestras del calibrador se reconstituyeron con 2.5 ml de una solución de acetato amónico 0.1 M conteniendo 1 mg/ml de sacarosa, para obtener una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. La solución se repartió en alícuotas de 100  $\mu$ l, que se almacenaron a -20°C para uso ulterior.

Como se ha descrito ya en Materiales, el calibrador es una muestra de heparina no fraccionada parcialmente degradada por heparinasa. La acción de esta enzima causa la partición de la heparina, dejando en el extremo no

reductor del fragmento resultante, un residuo de ácido urónico no saturado con absorbancia en el espectro ultravioleta ( $\lambda$  máx. 235 nm). La heparina no fraccionada no tiene tal absorbancia. Se estableció que la relación del número de cadenas que llevan el cromóforo sobre las que no lo llevan es constante para cada preparación y es independiente de la longitud de la cadena. La absorción UV a 235 nm puede por consiguiente estimarse una medida relativa de la concentración molar (nº de moléculas) a lo largo de todo el rango de peso molecular de la heparina. Se asume además que el índice de refracción diferencial (IR) es una medida relativa de la concentración de masa y por consiguiente la relación IR/UV es una medida relativa de peso molecular.

### **Muestras**

Se incluyeron en el estudio muestras de HNF (PI) y de cuatro HBPM comerciales (FRG, LOG, FRX y CLX). Para los ensayos, se prepararon soluciones de concentración 10 mg/ml en acetato amónico 0.1M, conteniendo 1 mg/ml de sacarosa, de cada una de las heparinas referidas.

### **Procedimiento**

#### **- Calibración**

El método utiliza un único patrón de calibración, que cubre un rango de masa molecular de 600 Da (disacáridos) a aproximadamente 10 kDa. Este rango es suficiente para caracterizar las HBPM pero no puede aplicarse al análisis de HNF.

Se aplicaron 20  $\mu$ l de la solución de 10 mg/ml del calibrador sobre el equipo descrito, utilizando como fase móvil acetato amónico 0.1 M a un flujo



de 0.5 ml/min. La longitud de onda del detector UV fue 234 nm y la sensibilidad del refractómetro de 0.01.

El tiempo de retraso entre los dos detectores utilizados, UV e IR, fue exactamente determinado para asegurar que en los cálculos se utilizarían segmentos de elución correspondientes, es decir que los cromatogramas de cada uno de ellos podían ser alineados correctamente. Los tiempos de retención utilizados en la calibración fueron los correspondientes al detector IR. Es por consiguiente esencial que una vez que el sistema se ha calibrado no se produzca ningún cambio en el proceso cromatográfico.

Como se ha indicado anteriormente el grupo cromóforo que lleva el calibrador es espectrofotométricamente detectable por su absorbancia en el espectro UV a 234 nm. Si durante la cromatografía, el eluyente de la columna es monitorizado con un detector UV a 234 nm y con un detector de índice de refracción, se obtiene una señal que es proporcional al número de moléculas (UV 234) y a la masa (detector IR) en cualquier punto del patrón de elución. Puesto que la masa molecular es igual a la masa por molécula, esta cantidad puede ser calculada en cualquier punto, siempre que las constantes de proporcionalidad sean conocidas.

Estas constantes pueden ser calculadas a partir de una posición en el cromatograma donde la masa molecular sea conocida, por ejemplo en la posición de un tetra o un hexasacárido. Nielsen estableció que estos factores varían muy poco o nada a lo largo de la elución de las preparaciones de HBPM degradadas enzimáticamente. Debe hacerse una asunción para la masa molecular del tetra o hexasacárido "conocido" puesto que el oligómero de heparina es heterogéneo debido a las diferencias en el grado de sulfatación. Por motivos de simplicidad, se está haciendo convencional aproximar el peso

molecular de una unidad de disacárido a un tamaño de 600 Da. Esta convención se siguió en el método que se describe.

El factor de normalización utilizado para calcular el peso molecular de la relación IR/UV se obtuvo a partir del área total bajo las curvas de UV ( $\Sigma UV_{234}$ ) e IR ( $\Sigma IR$ ), excluyendo sales de la muestra y picos del solvente al final de los cromatogramas, determinando el cociente de la relación entre el área de la respuesta de IR y la respuesta UV. El factor "F" se calculó entonces con ayuda del valor  $M_{nn}$ , Número de Masa Molecular Media del calibrador, que se incluye con la información distribuida con este patrón.

La relación UV/IR se midió en el máximo de cada pico y se calculó un factor de normalización (F) de forma que IR/UV (norm.) = IR/UV x F = n. Los pesos moleculares pueden calcularse a partir de estos valores normalizados: PM = 600n. La tabla resultante de tiempos de retención y pesos moleculares correspondientes, se utilizó para desarrollar una curva de calibración para el sistema cromatográfico. Estos cálculos se realizaron con la ayuda del software PL Caliber™ GPC/SEC.

#### - Análisis de muestras.

Una vez calibrado el sistema, se analizaron las muestras problema, siguiendo exactamente el mismo método descrito para el calibrador, asegurando la completa elución de la muestra y picos del solvente.

La masa molecular media se define por la expresión  $\Sigma(RI_i M_i / \Sigma RI_i)$ , donde  $RI_i$  es la cantidad de sustancia que se eluye en la fracción "i" y  $M_i$  la masa molecular correspondiente a la fracción. En base a las lecturas de los índices de refracción, se calcularon con el mismo software ya mencionado, la masa

molecular media, y el porcentaje de moléculas con masa molecular inferior a 3000 Da, entre 3000 y 8000 Da y superior a 8000 Da, para cada una de las muestras estudiadas.

### **III.2.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada**

El Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) es el ensayo más ampliamente utilizado en el laboratorio clínico para la monitorización de heparina (Thomson y Poller, 1989). El fundamento del método consiste en coagular el plasma con calcio y una cantidad óptima de fosfolípidos (factor 3 plaquetario). Este método fue diseñado para demostrar las deficiencias de la vía intrínseca, generación de trombina en la coagulación intrínseca, pero está también influenciado por cualquier deficiencia a lo largo del tramo final de la cascada de la coagulación. En la práctica, estará afectado por todos los factores de coagulación excepto Factor VII y Factor 3 Plaquetario (F3P).

#### **Reactivos**

Activador. Se utilizó caolín como activador para obtener una activación superficial óptima del factor XII, a la concentración de 5 mg/ml en solución salina y un tiempo de activación de 10 min. Tiempos de activación más cortos pueden utilizarse pero tienden a dar tiempos de coagulación más largos y mayor variabilidad. Muchos reactivos comerciales contienen otros activadores distintos de caolín, especialmente ácido elágico, con el inconveniente de producir pendientes más planas (Barrowcliffe y Gray, 1981).

Fosfolípido. Los reactivos de fosfolípido difieren considerablemente en su sensibilidad a la heparina. En un estudio comparativo (Barrowcliffe y Gray, 1981) los reactivos más sensibles, esto es, aquéllos que daban la curva dosis-

respuesta de mayor pendiente dieron también los ensayos de heparina más precisos. En los ensayos APTT que figuran en la presente memoria se utilizó la preparación de fosfolípido NIBSC 86/516, a una dilución 1/300 en una solución 0.15 M de NaCl conteniendo 0.1 mM del agente antioxidante hidroxianisol butilado (BHA). Alternativamente, podía utilizarse TTS o solución salina normal si la preparación se iba a emplear de forma inmediata. La solución de trabajo, mantenida en baño de hielo durante los ensayos, se desechó al cabo de un máximo de 2.5 horas.

## **Muestras**

### HNF y HBPM

En el marco de este método, se utilizaron concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{g}$  de HNF (PI), 2 a 8  $\mu\text{g}$  de HBPM (PI) y 1 a 5  $\mu\text{g}$  de Clexane (lote 4221) por ml de plasma, que se prepararon de la forma siguiente para los ensayos:

- El patrón internacional de HNF se reconstituyó con 920  $\mu\text{l}$  de agua destilada para obtener una solución "stock" de concentración 10 mg/ml, que se repartió en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ , almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$ . A partir de estas alícuotas se prepararon diluciones de trabajo de concentraciones 10, 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en TTS. Para los ensayos, se tomaron alícuotas de 5 o 10  $\mu\text{l}$  de estas soluciones.

- Una solución stock de 10 mg/ml se obtuvo igualmente para el patrón internacional de HBPM que se reconstituyó con 1 ml de agua destilada. Su contenido se distribuyó y almacenó en las mismas condiciones que las indicadas para HNF. A partir de esta solución stock se obtuvieron una serie de diluciones de trabajo de concentraciones 40, 80, 120 y 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de HBPM

(PI) en TTS. De estas soluciones se tomaron 5  $\mu$ l para los ensayos.

- Para Clexane, se partió de una solución de concentración 100 mg/ml de esta preparación y se obtuvieron diluciones independientes de concentración 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ g/ml en TTS. Como en el caso anterior, se tomaron 5  $\mu$ l de estas soluciones para su análisis.

Todas las diluciones de trabajo se mantuvieron en baño de hielo durante los ensayos.

#### Concentrados de Factor 4 Plaquetario (F4P)

- NIBSC 83/505

Se estudiaron inicialmente concentraciones de 0.5 a 8 ng/ml de plasma que se prepararon a partir de las diluciones de trabajo de concentraciones 10, 20, 40, 80 y 160 ng/ml en TTS, de las que se tomaron 5  $\mu$ l para su adición a las muestras de plasma para ensayo. En ensayos subsiguientes se utilizaron concentraciones de 764 ng/ml y 382 ng/ml de plasma, obtenidas al reconstituir las ampollas con 0.5 y 1 ml de agua destilada respectivamente; 100  $\mu$ l de cada una de estas soluciones se utilizaron directamente en los ensayos.

- NIBSC 82/648

El contenido de las ampollas de esta preparación (500 ng) se reconstituyó con 1 ml y 0.5 ml de agua destilada, respectivamente. Se tomaron 100  $\mu$ l de cada una de estas soluciones, a fin de obtener concentraciones finales de 500 y 1000 ng de F4P/ml de plasma para ensayo.

- F4P (R)

Un lote de esta preparación (13 mg) se utilizó en los ensayos de APTT. Se disolvió en 2.6 ml de NaCl 2M, Tris 50 mM pH 7.4, para conseguir una solución stock de 5 mg/ml. El contenido se repartió y congeló de forma rápida y las alícuotas se almacenaron a -40°C.

Se analizaron cuatro series distintas de concentraciones de la preparación F4P(R):

a) 0.4 a 2  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, que se obtuvieron a partir de las diluciones de trabajo de concentraciones 80, 120, 160, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$  de NaCl 2 M Tris 50 mM pH 7.4, por adición de 5  $\mu\text{l}$  de estas soluciones en muestras de plasma heparinizado;

b) 5, 7, 10 y 20  $\mu\text{g}$  por ml de plasma, que se habían obtenido a partir de soluciones de 100, 140, 200 y 400  $\mu\text{g}$  por ml del diluyente de F4P, de las que se tomaron 5  $\mu\text{l}$  para los ensayos;

c) Una tercera serie, de concentraciones de 14, 25, 30, 35, 40, 45 y 50  $\mu\text{g}$  de F4P/ml de plasma que se prepararon, como en los casos anteriores, al tomar alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  de las soluciones de 280, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000  $\mu\text{g}$  de F4P/ml de NaCl 2 M Tris 50 mM pH 7.4, para su adición en las mezclas de ensayo;

d) Por último se estudió un rango de concentraciones superior, de 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, obtenidas al submuestrear 5  $\mu\text{l}$  de las soluciones de trabajo de 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000  $\mu\text{g/ml}$  de NaCl 2M Tris 50 mM en la mezcla final de ensayo.

Todo el material de F4P reconstituido, se utilizó únicamente durante la jornada de trabajo, manteniéndolo en baño de hielo.

### Procedimiento

Alícuotas de PPP se descongelaron en baño de agua a 37°C y se mantuvieron en baño de hielo. Para los ensayos se prepararon mezclas de 90  $\mu$ l de plasma, 5  $\mu$ l de HNF o HBPM y 5  $\mu$ l de F4P, a las concentraciones adecuadas de estos materiales (Diseño 1). En cada ensayo se incluyeron controles para determinar el tiempo de coagulación del plasma en ausencia de heparina, añadiendo 5  $\mu$ l de TTS y 5  $\mu$ l de la dilución correspondiente de F4P a 90  $\mu$ l de plasma; el tiempo de coagulación del plasma en ausencia de heparina y de F4P, añadiendo 10  $\mu$ l de TTS en su sustitución; el tiempo de coagulación del plasma heparinizado en ausencia de F4P, sustituyendo este material por su diluyente y por último para conocer la influencia de las distintas concentraciones de F4P en ausencia de heparina, se añadieron 5  $\mu$ l de su diluyente y 5  $\mu$ l de TTS. La composición de las muestras estudiadas en este diseño es equivalente a la utilizada en los ensayos de inhibición de generación de trombina, que se describen más adelante.

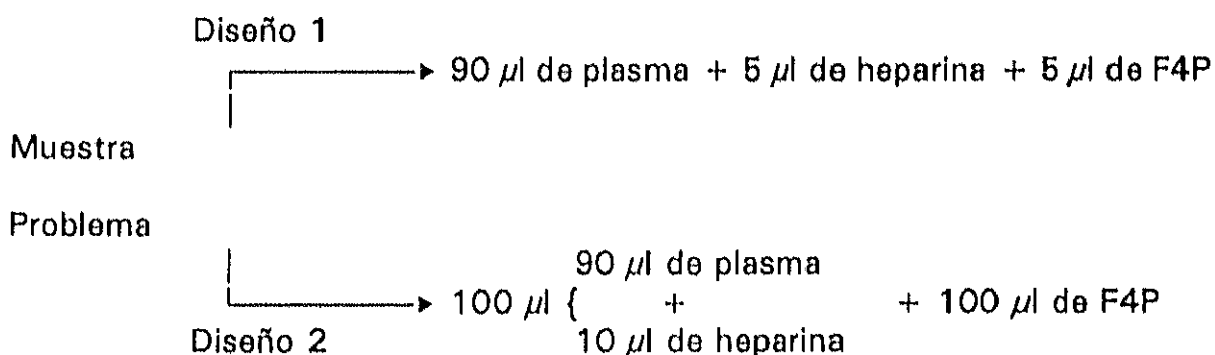
100  $\mu$ l de cada muestra problema, distribuidos en tubos de plástico, se dispusieron en los coagulómetros y se atemperaron a 37°C durante 1 minuto. Cada una de las muestras se valoró por duplicado. Se añadieron 100  $\mu$ l de caolín bien resuspendido (5 mg/ml en solución salina) e igualmente atemperado a 37°C, y se agitó para su mezcla. Un intervalo de 30 seg se permitió entre cada coagulómetro de cuatro canales. Transcurridos 9 min y 45 seg desde la adición del caolín, se añadieron 100  $\mu$ l de fosfolípido (1/300 en NaCl 0.15 M BHA 0.1mM) sobre cada mezcla de incubación en cada coagulómetro. Exactamente a los 10 min se inició la reacción de coagulación, por

recalcificación con 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  25 mM en cada uno de los tubos, y se recogieron después los tiempos de coagulación.

Se utilizó además un diseño alternativo para la preparación de las muestras problema: 100  $\mu$ l de plasma heparinizado (90  $\mu$ l de plasma más 10  $\mu$ l de HNF) a los cuales se añadieron 100  $\mu$ l de la concentración adecuada de F4P (Diseño 2). Esta opción se escogió para aprovechar la máxima concentración permitida por el contenido de las ampollas de concentrado de F4P, 83/505 y 82/648. Igualmente, se incluyeron procedimientos de control para identificar el efecto de cada concentración de F4P, en ausencia de HNF, así como el efecto de 1  $\mu$ g de HNF y de las soluciones tampón.

Se recoge a continuación un esquema de los diseños 1 y 2 antes referidos y del método APTT utilizado.

### Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada



100  $\mu$ l de caolín 5 mg/ml en solución salina normal

Incubación a 37°C

A 9 min 45 seg, 100  $\mu$ l de fosfolípido (dilución 1/300).

A 10 min, 100  $\mu$ l de 25 mM de  $\text{CaCl}_2$

Recogida del tiempo de coagulación



## **Sistema de detección del coágulo**

La detección del coágulo en los experimentos de APTT se obtuvo en cuatro coagulómetros cuyo mecanismo de funcionamiento es electromecánico. Estos coagulómetros emplean el método "gancho", es decir que el punto de coagulación se determina por movimiento del gancho en la muestra de coagulación a intervalos regulares. En el instante de la coagulación se extrae del líquido un pequeño filamento, que transmite una señal de registro al sistema electrónico.

## **Cálculos**

Los tiempos de coagulación se recogieron en segundos. Los resultados se expresaron como las medias de los tiempos de coagulación obtenidos para cada uno de los duplicados de las muestras.

### **III.2.3 Métodos de Ensayo Amidolíticos**

#### **III.2.3.1 Inhibición de Factor Xa**

La heparina se determinó como un complejo con ATIII en plasma. El complejo heparina-ATIII o plasma heparinizado se incubó con exceso de Factor Xa por un período definido de tiempo. La actividad de Factor Xa residual fue así medida por su acción catalítica sobre un sustrato sintético específico que libera el cromógeno p-nitroanilina (pNA). La absorbancia del pNA libre, medida a 405 nm, disminuye linealmente con el incremento de la concentración de heparina. Se recoge a continuación un esquema de la secuencia de reacciones que tiene lugar en los ensayos amidolíticos de inhibición de Factor Xa.

### Secuencia de Reacciones

1. Heparina + Plasma (ATIII)  $\longrightarrow$  Complejo Heparina - ATIII
2. Complejo Heparina - ATIII + Factor Xa (exceso)



Heparina - ATIII - Xa + Factor Xa Residual

3. Sustrato cromogénico + FXa residual  $\longrightarrow$  pNA libre

### Reactivos

#### Plasma o ATIII

Para medir la actividad anti-Xa de heparinas puede utilizarse ATIII purificada, disponible comercialmente, en lugar de plasma. El uso de ATIII purificada elimina el problema de antagonistas de heparina en plasma, que podrían estar presentes en distintas cantidades en muestras de plasma diferentes, pudiendo influenciar las muestras patrón y problema de heparina en varios grados. En otras palabras, puede estimarse que el uso de ATIII dará una mejor precisión, tanto intra-laboratorio como inter-laboratorios (Barrowcliffe et al., 1985). Sin embargo, la actividad global en plasma de las preparaciones de HBPM está más probablemente relacionada con su actividad *in vivo*, y por esta razón, el uso de plasma se ha preferido para los experimentos presentados en esta memoria.

Las alícuotas necesarias de PPP se descongelaron en un baño de agua a 37°C, inmediatamente antes del comienzo de los ensayos.

## Factor Xa

En un estudio sobre distintas fuentes de Factor Xa, Walenga et al. (1985), encontraron que el Factor Xa de origen humano daba resultados diferentes del Factor Xa de origen bovino cuando se comparaba una HBPM con HNF. Sin embargo, estudios en los que se compararon distintas HBPM comerciales, no mostraron diferencias importantes entre los resultados obtenidos con Factor Xa bovino o humano (datos no publicados). El Factor Xa bovino es inhibido más rápidamente que el Factor Xa humano, ya sea en presencia o ausencia de heparina, y esto produce una curva dosis-respuesta de mayor pendiente. A causa de esta mayor sensibilidad y más fácil disponibilidad, el Factor Xa bovino se prefirió al Factor Xa humano para los ensayos de potencia de las HBPM. Únicamente se utilizó Factor Xa Humano en experimentos particulares a lo largo del presente trabajo; es el caso de los estudios de neutralización de heparina por F4P, en presencia y ausencia de calcio, que se describen más adelante.

Los viales de Factor Xa bovino se reconstituyeron con 1 ml de agua destilada y su contenido se diluyó en tampón CAG para los ensayos, en la proporción indicada por el fabricante (1/1.5).

## Sustrato

Existen varios sustratos cromogénicos comerciales, específicos para Factor Xa, que pueden dar distintos valores de absorbancia a la misma concentración. Su elección no influye en los resultados de ensayos de actividad anti-Factor Xa de muestras problema *versus* un patrón de HBPM.

En todos los experimentos de actividad anti-Xa recogidos en esta

memoria, se utilizó el sustrato cromogénico S-2765 de Kabi. Se preparó una solución "stock" en agua destilada estéril, a una concentración 3 mM, que se diluyó posteriormente en tampón Tris-EDTA, para obtener una concentración final de 0.5 mM para los ensayos.

### **Patrones y Muestras**

El uso de un patrón apropiado para valorar las muestras de HBPM comerciales tiene la gran ventaja de que la variabilidad en el sistema de ensayo afecta de forma semejante tanto al patrón como a la muestra problema, y por consiguiente se minimiza el efecto de diferencias debidas a reactivos y métodos de medida sobre la potencia de la muestra problema. Para obtener una estimación de potencia válida, las preparaciones patrón y problema tienen que comportarse de forma similar en el sistema de ensayo. Esta fue la razón para el establecimiento de un patrón internacional de HBPM (Barrowcliffe et al., 1985).

Todas las HBPM comerciales estudiadas fueron comparadas frente al 1<sup>er</sup> Patrón Internacional de HBPM. Este patrón se reconstituyó con 1 ml de agua destilada y se distribuyó en alícuotas de 50  $\mu$ l que pueden almacenarse a -20°C. Para obtener una solución "stock" de 10 UI/ml, se añadieron 8.35 ml de TTS a cada una de las alícuotas necesarias para el ensayo. A partir de esta solución, se prepararon dos series independientes de diluciones en TTS a 0.5, 1, 2 y 3 UI/ml que se utilizaron inmediatamente.

Todas las muestras de HBPM comerciales (FRG, LOG, FRX, CLX) se diluyeron en TTS, de acuerdo a la potencia esperada, para obtener dos series independientes de los mismos niveles de dilución que el patrón, procediéndose de la misma forma para el ensayo.

## Procedimiento

Se preparó una dilución 1/10 de cada una de las dos series de diluciones del patrón y de la muestra, en plasma normal. De este modo se obtuvieron concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 UI/ml. El ensayo se realizó en un analizador microcentrífugo automatizado ACL 300 Research. El orden de aplicación de las diluciones de patrón y muestras en el rotor de este analizador siguió el diseño  $P_1M_1M_2P_2$ , donde  $P_1, P_2$  y  $M_1, M_2$  representan las dos series independientes de cuatro diluciones de patrón y muestra problema respectivamente. En el ensayo, un volumen de muestra de 10  $\mu$ l reaccionó durante 1 minuto con 50  $\mu$ l de Factor Xa bovino; tras haber transcurrido este tiempo se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato cromogénico (S-2765) y después de un minuto exactamente, se leyó el cambio en absorbancia a 405 nm. Se indica a continuación la secuencia del proceso:

Volumen muestra:	10 $\mu$ l
Factor Xa bovino:	50 $\mu$ l
Tiempo de incubación:	1 minuto
Sustrato S-2765 (0.5 mM):	100 $\mu$ l
Tiempo de reacción :	1 minuto
Lectura de absorbancia a 405 nm	

## Cálculos

El principio básico de medida de la potencia de una HBPM, como para otros productos biológicos, es comparar las curvas dosis-respuesta de las preparaciones patrón y problema. El principio fundamental en la estimación de potencia es que la preparación problema se ha de comportar exactamente como una dilución del patrón. Este hecho se comprobó en cada ensayo

utilizando un análisis estadístico basado en un método de líneas paralelas (Finney, 1978; Barrowcliffe y Curtis, 1987; European Pharmacopoeia, 1993). Los ensayos no paralelos significan que la potencia de la preparación problema variará con distintas diluciones, y es por consiguiente una indicación de que el sistema de ensayo debe modificarse o debe emplearse un patrón diferente.

Basado en estos principios, se utilizó un programa informático de análisis de varianza, sobre una representación del logaritmo de la concentración de HBPM frente a absorbancia. Detalles de este método de cálculo, así como del utilizado para combinar las potencias obtenidas en varios ensayos independientes, pueden encontrarse en el apartado de Análisis Estadísticos.

### **III.2.3.2 Inhibición de Factor Xa en presencia de F4P**

Para investigar el efecto de F4P sobre los ensayos de actividad anti-Xa, se emplearon concentraciones de 1  $\mu\text{g}$  de HNF(PI), 2  $\mu\text{g}$  de HBPM(PI), 3  $\mu\text{g}$  de FRG y LOG, 4  $\mu\text{g}$  de FRX y 5  $\mu\text{g}$  de CLX, por ml de plasma. En estos experimentos se utilizó factor Xa humano y se analizaron concentraciones de F4P (R), de 14, 25 y 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma. Las concentraciones adecuadas para ensayo, de cada una de las heparinas, se obtuvieron al tomar 10  $\mu\text{l}$  de las diluciones de trabajo, con concentraciones de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (HNF), 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (HBPM), 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (FRG y LOG), 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (FRX) y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (CLX) en TTS. Se desarrollaron asimismo curvas dosis-respuesta de cada una de las heparinas investigadas en el rango de concentraciones siguiente: 0.25 a 2  $\mu\text{g}$  (HNF), 1 a 4  $\mu\text{g}$  (HBPM), 0.5 a 3  $\mu\text{g}$  (FRG), 1 a 5  $\mu\text{g}$  (LOG, FRX) y CLX) por ml de plasma. En el caso de F4P(R), se prepararon diluciones de trabajo a concentraciones de 280, 500 y 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de diluyente de F4P, de las que se tomaron igualmente 10  $\mu\text{l}$  para la mezcla de ensayo.

A fin de determinar la concentración adecuada de factor Xa humano para su utilización en ensayos anti-Xa en presencia de plasma, se obtuvieron diluciones seriadas de factor 2 del concentrado de factor Xa, desde 1/30 a 1/360 en tampón CAG. Para su valoración se estudiaron mezclas de reacción semejantes a las ya descritas en el método anterior, intercambiando los pocillos de muestra y enzima en el analizador. Se trató de utilizar una concentración de factor Xa humano (dilución 1/200) que rindiera una absorbancia similar a la obtenida con el concentrado de factor Xa bovino, en ausencia de heparina y F4P, al añadir una misma concentración del sustrato cromogénico S-2765. El sustrato cromogénico S-2765 y muestras de PPP del lote 15/1, se prepararon siguiendo exactamente las condiciones descritas previamente en la determinación de la actividad específica de heparinas.

10  $\mu$ l de la concentración adecuada de HNF o HBPM y 10  $\mu$ l de las distintas concentraciones de F4P se mezclaron con 180  $\mu$ l de PPP. Todos los ensayos se realizaron en el analizador automático ACL 300 Research, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. En cada ensayo se incluyeron controles de plasma en presencia de las concentraciones de HNF o de las HBPM o de F4P incluidas en el ensayo, así como sus curvas dosis-respuesta correspondientes.

La concentración de HNF y de todas las HBPM se expresó en términos de concentración en peso ( $\mu$ g/ml), en lugar de concentraciones molares. La utilización del peso molecular medio no sería representativo del amplio rango de distribución del peso molecular en estas preparaciones, y en particular de la distribución de las moléculas de alta afinidad por ATIII, por lo que se estimó que la interpretación de las concentraciones molares podía llevar a confusión. El mismo concepto se aplicó para la preparación de las muestras en todos los ensayos donde se han utilizado unidades de peso.

## Cálculos

El porcentaje de neutralización de HNF y de las HBPM analizadas, se calculó a partir de la fórmula que se recoge en el apartado III.2.6.

### III.2.3.3 Inhibición de Factor Xa en presencia de F4P y Calcio

El efecto de  $\text{CaCl}_2$  3 mM (concentración fisiológica) sobre la actividad anti-Xa de HNF(PI) y cinco HBPM diferentes, a las mismas concentraciones indicadas en el método anterior, se valoró utilizando ATIII purificada (NIBSC 87/742) y factor Xa humano, en presencia y ausencia de  $14\mu\text{g/ml}$  de F4P(R).

La razón para utilizar ATIII, en lugar de plasma, en estos ensayos anti-Xa se basó en el hecho de que al ser el plasma citratado, la adición de  $\text{CaCl}_2$  podría fácilmente causar coagulación. Sin embargo, los ensayos con ATIII pueden realizarse en presencia y ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . También por razón de la presencia de calcio, se utilizó TTS albúmina para diluir factor Xa, en lugar del tampón CAG, ya que el citrato tomaría el calcio de la mezcla de reacción. El tampón EDTA, diluyente del sustrato cromogénico, podía así mismo acomplejar el calcio pero se estimó que la reacción del factor Xa con ATIII estaría ya finalizada en la fase en la que se añadía el sustrato cromogénico.

A fin de conseguir la concentración 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  en las condiciones del ensayo, se preparó inicialmente una solución de 0.5 UI de ATIII por ml de TTS albúmina 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta solución se obtuvo mezclando la cantidad necesaria de tampón TTS albúmina 40 mM  $\text{Ca}^{2+}$  con el mismo volumen de una solución de 1UI de ATIII por ml de TTS albúmina. Las mezclas de reacción se formaron con  $10\mu\text{l}$  de heparina y  $10\mu\text{l}$  de diluyente de F4P o  $10\mu\text{l}$  de F4P(R)



(280  $\mu\text{g/ml}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  de TTS o 10  $\mu\text{l}$  de heparina y de F4P (R), que se añadieron a 180  $\mu\text{l}$  de ATIII en ausencia o presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentración 3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  se alcanzó en la mezcla de reacción final tras añadir 50  $\mu\text{l}$  de Factor Xa a 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra problema diluída. Excepto las particularidades indicadas hasta aquí, todas las condiciones del ensayo anti-Xa se mantuvieron tal como se han descrito previamente, utilizándose de igual forma el sustrato cromogénico S-2765.

Un diseño PMMP o MPPM se siguió también en estos ensayos para la disposición de las muestras en el rotor del analizador, siendo "P" las muestras preparadas en ATIII  $\text{Ca}^{2+}$  y "M" las muestras preparadas en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En los ensayos se incluyeron controles del efecto de la adición de  $\text{CaCl}_2$  sobre la proporción de hidrólisis de S-2765 por factor Xa y sobre la proporción de neutralización de factor Xa por ATIII, en ausencia de heparina. Se valoró asimismo la influencia de la presencia de calcio sobre cada uno de los controles de F4P(R), de heparina, o de tampón en ausencia de F4P y de heparina, así como la influencia de la posición de las muestras en el rotor.

### **Cálculos**

El porcentaje de neutralización de la actividad anti-Xa de HNF y de las HBPM analizadas, por F4P(R) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , se calculó a partir de la fórmula desarrollada en el apartado III.2.6.

#### **III.2.3.4 Inhibición de Factor IIa**

El fundamento de este método es el mismo que para el ensayo amidolítico de inhibición de factor Xa. La trombina se incubó durante un corto

período de tiempo con ATIII purificada conteniendo heparina, y la actividad de trombina residual se determina tras la adición de un sustrato cromogénico específico para trombina (Larsen et al., 1978; Handeland et al., 1984). La p-nitroanilina (pNA) liberada puede medirse ya sea como absorbancia por minuto o como un valor de absorbancia fijo a 405 nm, después de haber parado la reacción con ácido acético.

#### Secuencia de reacciones

1. Heparina + ATIII  $\longrightarrow$  Complejo Heparina - ATIII
2. Complejo Heparina - ATIII + Factor IIa (exceso)  
 $\downarrow$   
Heparina - ATIII - IIa + Factor IIa residual
3. Sustrato cromogénico + FIIa residual  $\longrightarrow$  pNA libre

#### Reactivos

##### Plasma o ATIII

Por razones de sencillez del ensayo, en los experimentos de actividad anti-IIa se utilizó ATIII purificada; el uso de plasma produce coagulación muy rápidamente tras la adición de trombina. Por otro lado, en el estudio de colaboración para calibrar el 1<sup>er</sup> PI de HBPM (Barrowcliffe et al., 1988) no se encontraron diferencias entre los resultados de los ensayos realizados con plasma o con concentrado de ATIII.

El concentrado de ATIII que se utilizó en los ensayos, NIBSC 87/744, se diluyó a una concentración de 0.5 UI/ml con TTS Albúmina 1%. Se utilizó

plasma humano desfibrinado en experimentos puntuales; p.e. en el caso de los estudios de neutralización de heparina por F4P que se recogen más adelante.

### Trombina

En los ensayos amidolíticos de actividad anti-IIa referidos en esta memoria, se utilizó únicamente trombina humana. Se preparó a una concentración de 5 UI/ml, diluyendo la preparación en TTS albúmina, inmediatamente antes de los ensayos.

### Sustrato

En todos los experimentos de actividad anti-IIa se utilizó el sustrato Kabi S-2238. Se preparó una solución "stock" en agua destilada estéril a una concentración 3 mM, que se diluyó posteriormente en tampón Tris-EDTA albúmina 1 %, a una concentración final de 0.25 mM para los ensayos.

### **Patrones y Muestras**

La información descrita para los ensayos anti-Xa es igualmente válida para los ensayos de actividad anti-IIa.

Todas las HBPM comerciales estudiadas se analizaron frente al 1<sup>er</sup> Patrón Internacional de HBPM. A este efecto, muestras del Patrón Internacional se reconstituyeron con 1 ml de agua destilada y su contenido se distribuyó en alícuotas de 100  $\mu$ l. Estas alícuotas pueden almacenarse a -20°C. A fin de obtener una solución "stock" de 10 UI/ml, se añadieron 6.55 ml de TTS albúmina a cada una de las alícuotas necesarias para el ensayo. Se prepararon seguidamente diluciones seriadas de 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 UI/ml,

en TTS albúmina que se usaron inmediatamente. Las muestras problema se diluyeron en TTS, de acuerdo a las potencias esperadas, hasta los mismos niveles de dilución que el patrón, procediéndose de la misma forma para el ensayo.

### Procedimiento

Para obtener concentraciones finales de ensayo de 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 ui/ml, se prepararon nuevas diluciones 1/10 del patrón y muestras problema en una solución de ATIII, 0.5 UI/ml en TTS Albúmina. Como en el caso de los ensayos anti-Xa, la secuencia final de reacciones con el factor activado y el sustrato cromogénico se realizó en un analizador microcentrífugo automatizado ACL 300 Research. El orden de aplicación de las diluciones de patrón y muestra siguió igualmente el diseño  $P_1M_1M_2P_2$ . El tiempo de reacción de cada muestra problema con trombina, a 37°C, se estableció en 60 segundos. El cambio en absorbancia, tras añadir el sustrato cromogénico, se leyó a 405 nm después de un minuto. Se indica a continuación un resumen del orden y condiciones de carga en el analizador:

Volumen de muestra:	10 $\mu$ l
Trombina humana:	50 $\mu$ l
Tiempo de incubación:	1 minuto
Sustrato S-2238 (0.25 mM):	100 $\mu$ l
Tiempo de reacción:	1 minuto
Lectura de absorbancia a 405 nm	

### Cálculos

La información recogida bajo este epígrafe en la descripción del método

de actividad anti-Factor Xa (III.2.3.1) es válida igualmente en el caso del método amidolítico de actividad anti-Factor IIa.

### **III.2.3.5 Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P**

La inactivación de trombina humana por ATIII dependiente de heparina, se estudió igualmente en presencia de F4P. Para investigar su efecto sobre los ensayos de actividad anti-IIa, se utilizaron las siguientes concentraciones de HNF y de las HBPM: 1  $\mu\text{g/ml}$  para HNF(PI), 2  $\mu\text{g/ml}$  para HBPM(PI), 3  $\mu\text{g/ml}$  para FRG y LOG, 4  $\mu\text{g/ml}$  para FRX y 5  $\mu\text{g/ml}$  para CLX. En estos experimentos se analizaron concentraciones de dos lotes distintos de F4P(R), que variaron de 6  $\mu\text{g}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  en la mezcla final de ensayo. La preparación de ATIII NIBSC 87/742, alcuotas del concentrado de trombina humana TH0015, y el sustrato cromogénico S-2238 se utilizaron siguiendo la misma pauta ya descrita en el apartado III.2.3.4.

10  $\mu\text{l}$  de la concentración adecuada de HNF o HBPM y 10  $\mu\text{l}$  de las distintas concentraciones de F4P se mezclaron con 180  $\mu\text{l}$  de ATIII purificada. Todos los ensayos se realizaron en el analizador ACL 300 Resarch, siguiendo el procedimiento descrito previamente. En cada ensayo se desarrollaron también las curvas dosis-respuesta de HNF o de cada una de las HBPM en estudio. Se incluyeron asimismo controles de la acción inhibitoria de factor IIa en ausencia y en presencia de las concentraciones de HNF, de las HBPM o de F4P(R) sobre las que se valoró la capacidad de neutralización de la actividad anti-IIa de las heparinas en estudio por F4P. Se valoraron al menos dos ampollas de cada material y lote estudiados.

El porcentaje de neutralización de heparina por F4P se calculó igualmente mediante la fórmula desarrollada en el apartado III.2.6.

### **III.2.3.6 Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P y Plasma Desfibrinado**

Se desarrollaron también ensayos amidolíticos para medir la actividad residual anti-IIa de HNF y de las HBPM en presencia de F4P, utilizando plasma desfibrinado en lugar de ATIII purificada. En estos ensayos se mantuvieron las condiciones ya descritas para el resto de los elementos, incluyendo las concentraciones de HNF y de las HBPM. Se estudió únicamente una concentración de F4P(R), la de 14  $\mu\text{g/ml}$  de plasma.

El porcentaje de neutralización de HNF y de las HBPM por F4P(R), en las condiciones de ensayo, se calculó en base a la fórmula desarrollada en el apartado III.2.6.

### **III.2.3.7 Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P y Calcio**

El efecto de  $\text{CaCl}_2$  3 mM (concentración fisiológica) sobre la actividad anti-IIa de HNF y de las cinco HBPM, a las mismas concentraciones ya referidas, se valoró utilizando ATIII purificada, en presencia y ausencia de una concentración fija de F4P (14  $\mu\text{g/ml}$ ).

A fin de conseguir la concentración 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  en las condiciones del ensayo, se preparó inicialmente una solución de 0.5 UI de ATIII por ml de TTS albúmina 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  pH 7.4, y se diluyeron las muestras a valorar en 180  $\mu\text{l}$  de esta solución. La concentración 3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  se alcanzó en la mezcla de reacción final, tras añadir 50  $\mu\text{l}$  de trombina humana a 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra problema diluída.

Excepto las particularidades indicadas hasta aquí, todas las condiciones de los ensayos anti-IIa se mantuvieron tal como se han descrito previamente.

En los ensayos se incluyeron controles del efecto de la adición de  $\text{CaCl}_2$  sobre la proporción de hidrólisis del sustrato S-2238 por trombina, y sobre la proporción de neutralización de trombina por AT III, en ausencia de heparina.

El efecto de neutralización de F4P(R) sobre la actividad anti-IIa de HNF y de las HBPM, en presencia de calcio, se cuantificó aplicando la misma fórmula referida en el método anterior.

#### **III.2.3.8 Inhibición de Factor IIa en presencia de F4P, Calcio y Fosfolípido**

Otros ensayos anti-IIa se llevaron a cabo en presencia de ATIII, utilizando dos concentraciones diferentes de calcio, 25 mM y 3 mM, y fosfolípido. El fosfolípido se utilizó a la misma concentración que para el ensayo de generación de trombina (1/300).

Para preparar las mezclas de reacción, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de las diluciones de trabajo de HNF(PI) y de F4P(R), que se diluyeron con 180  $\mu\text{l}$  de ATIII, para obtener una concentración final de 1  $\mu\text{g/ml}$  de HNF y 14  $\mu\text{g/ml}$  de F4P. Se añadieron volúmenes iguales (200  $\mu\text{l}$ ) de fosfolípido y calcio, ya fuera  $\text{CaCl}_2$  25 mM ó 3 mM. Las diluciones de trabajo de HNF(PI), 20  $\mu\text{g/ml}$  de TTS, y F4P(R), 280  $\mu\text{g/ml}$  de diluyente de F4P, se obtuvieron de la misma forma que en los métodos anteriores, a partir de alícuotas descongeladas inmediatamente antes de los ensayos. En todos ellos se incluyeron controles de cada uno de los componentes de las mezclas de reacción: HNF(PI), F4P(R), calcio y fosfolípido, para asegurar que el efecto de neutralización dependería únicamente de la acción de F4P sobre HNF. Ninguna otra condición del método original anti-IIa se modificó en estos ensayos. En este método se estudió únicamente la neutralización de HNF por F4P.

El porcentaje de neutralización de la actividad anti-IIa de 1  $\mu\text{g}$  de HNF por 14  $\mu\text{g}$  de F4P(R), en presencia de calcio y fosfolípido se calculó, aplicando la fórmula que se recoge en el apartado III.2.6.

#### **III.2.4 Generación de Trombina en PPP**

Este ensayo valora la formación de trombina y su neutralización en plasma. Es un ensayo global, útil para determinar el potencial de generación de trombina del plasma en presencia de anticoagulantes, fosfolípido u otras sustancias que puedan afectar a la formación de trombina.

#### **Reactivos**

##### **PPP desfibrinado**

Alícuotas de PPP, descongeladas en baño de agua a 37°C, se desfibrinaron por adición de Arvin a una concentración de 0.5 UI/ml de plasma. El plasma, con el agente desfibrinante, se mantuvo a 37°C durante aproximadamente 10 min. El coágulo de fibrina formado se extrajo de la muestra de plasma con ayuda de un bastoncillo de madera. Para evitar la presencia de pequeñas trazas de fibrina durante el ensayo, las muestras de plasma desfibrinadas se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Se procedió después a un cambio de tubo para desechar el posible depósito de fibrina. En los estudios de generación de trombina en PPP se utilizaron tres lotes de este plasma: 31/7, 13/11 y 15/1.

##### **Fosfolípido**

La preparación NIBSC 85/516 se reconstituyó con 1 ml de agua



destilada. Alícuotas de esta preparación, de 25 ó 50  $\mu$ l, se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  o a inferior temperatura. Para su uso en el ensayo de generación de trombina, se preparó una dilución 1/300 en el diluyente de fosfolípido. La solución de trabajo no se utilizó un tiempo superior a las 2 horas y media.

### Fibrinógeno bovino

Siguiendo las instrucciones del fabricante, cada vial se reconstituyó con 5 ml de agua destilada y se diluyó posteriormente con 5 ml de solución salina para obtener una concentración de 2.4 mg/ml, semejante a la concentración de fibrinógeno en plasma normal.

Cada lote de fibrinógeno se valoró, antes de su uso, frente al 1<sup>er</sup> patrón internacional de trombina, NIBSC 70/157. Una ampolla de este patrón (100 UI) se reconstituyó con 1 ml de agua destilada y una vez disuelto, su contenido se transfirió inmediatamente a un tubo de plástico. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l para preparar dos series independientes de diluciones en TTS albúmina, en un rango de 75 a 0.39 UI/ml, tomando duplicados para cada una de ellas. Se valoraron 50  $\mu$ l de cada dilución y un duplicado en 200  $\mu$ l de fibrinógeno, y se recogieron los tiempos de coagulación. Un único lote de fibrinógeno (FN 119) se utilizó en los ensayos de generación de trombina en PPP.

### **Muestras**

Se incluyeron en el estudio el 4<sup>o</sup> Patrón Internacional de HNF (NIBSC 82/502), el 1<sup>er</sup> Patrón Internacional de HBPM (NIBSC 85/600) y las 4 preparaciones comerciales de HBPM ya referidas. Se analizaron cuatro a cinco concentraciones diferentes ( $\mu\text{g/ml}$  plasma) de cada uno de estos materiales:

0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}$  de HNF(PI); 0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$  de HBPM (PI); 1, 2, 3 y 4  $\mu\text{g}$  de LOG y 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g}$  de FRG, FRX y CLX.

Para obtener estas concentraciones en la mezcla final de ensayo, se prepararon soluciones de trabajo, de concentraciones 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de TTS, de las cuales se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para los ensayos.

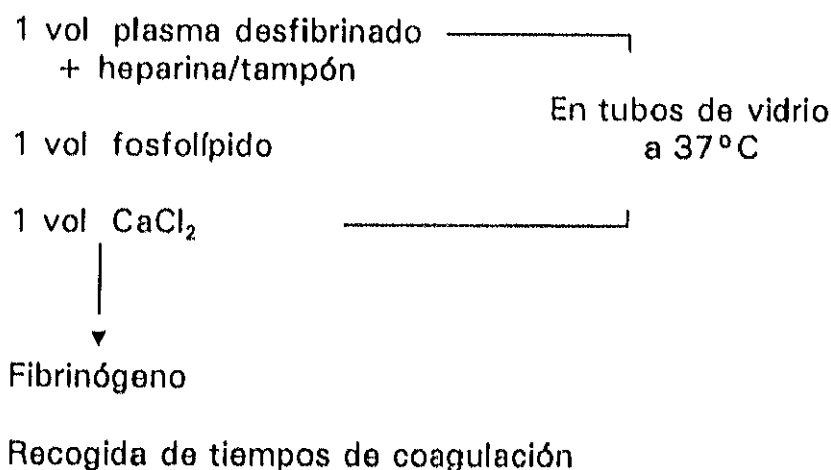
### Procedimiento

La activación intrínseca del sistema de la coagulación se desencadenó por contacto en tubos de vidrio, que se utilizaron para preparar la mezcla de reacción en cada serie de ensayos. La mezcla de reacción se formó con 900  $\mu\text{l}$  de PPP desfibrinado y 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones adecuadas de HNF(PI) y de las HBPM. Volúmenes iguales (1 ml) de plasma desfibrinado (con o sin heparina) y fosfolípido, se mezclaron en estos tubos. Previamente se habían situado en los canales de los coagulómetros tubos de plástico con 0.2 ml de fibrinógeno para su incubación a 37°C. Una media de 150 tubos fue necesaria para desarrollar una curva dosis-respuesta de al menos 3 puntos.

La mezcla de reacción, una vez atemperada a 37°C durante 1 minuto en los coagulómetros, se recalificó con 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  25 mM y se comenzó el tiempo de incubación. La formación de trombina se midió muestreando 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de incubación en 0.2 ml de fibrinógeno, a intervalos de 30 segundos, hasta que los tiempos de coagulación resultantes llegaron a ser inferiores a 30 segundos. Se continuó entonces tomando muestras de la mezcla de reacción a intervalos de 15 segundos, hasta que los tiempos de coagulación llegaron a ser de nuevo superiores a 30 segundos. A partir de este momento se mantuvieron intervalos de muestreo cada 30 segundos, hasta que los tiempos de coagulación fueron de aproximadamente 500 segundos, valor

que se encontraba asimismo para los tiempos de coagulación al comienzo de del ensayo. Un resumen del método presentado, se recoge en el esquema siguiente:

### Ensayo de Generación de Trombina - Sistema Intrínseco



### Cálculos

Los tiempos de coagulación recogidos se convirtieron en unidades internacionales de trombina por comparación con una curva patrón trombina-fibrinógeno, previamente establecida en la calibración del lote de fibrinógeno utilizado en los ensayos. En todos estos experimentos, la actividad de generación de trombina del plasma heparinizado, ya sea en presencia de HNF o HBPM, se comparó con la trombina generada en plasma normal en el que el contenido de heparina se había sustituido por TTS (control de plasma). La generación de trombina en ausencia de heparina se tomó como 100 %. El total de trombina generada se valoró representando la concentración de trombina para cada intervalo de submuestreo, y calculando después el área bajo la curva (AbC). Para dibujar y determinar este área se utilizó un programa informático que tiene en cuenta, para cada ensayo, los valores obtenidos en la curva

patrón trombina-fibrinógeno para la pendiente y la intersección con el eje de ordenadas.

El ensayo se utilizó para medir la inhibición de generación de trombina por HNF y varias HBPM, en el sistema de PPP. La trombina total generada se cuantificó también en base al pico de concentración de trombina producido, en comparación con el plasma control.

### III.2.5 Generación de Trombina en PPP en presencia de F4P

Para investigar el efecto de F4P sobre los ensayos de generación de trombina, se utilizaron concentraciones de HNF y de las HBPM que proporcionaron aproximadamente un 20% de generación de trombina residual. Estas concentraciones fueron 1  $\mu\text{g}$  de HNF (PI), 2  $\mu\text{g}$  de HBPM (PI), 3  $\mu\text{g}$  de FRG y LOG, 4  $\mu\text{g}$  de FRX y 5  $\mu\text{g}$  de CLX, por ml de plasma. Se prepararon a partir de diluciones de trabajo de concentraciones 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de TTS, de las que se tomaron 50  $\mu\text{l}$  para los ensayos. Se valoraron al menos dos ampollas diferentes de cada preparación y lote estudiados.

En estos experimentos se analizaron concentraciones de F4P(R), de dos lotes distintos, que variaron de 6  $\mu\text{g}$  a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma. Se prepararon previamente diluciones de trabajo de 120  $\mu\text{g}$  a 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de diluyente de F4P, a partir de las cuales se tomaron, como en el caso anterior, 50  $\mu\text{l}$ .

Para obtener la mezcla de reacción, 50  $\mu\text{l}$  de las concentraciones apropiadas de HNF(PI) o de las HBPM y 50  $\mu\text{l}$  de las concentraciones escogidas de F4P(R) se añadieron a 900  $\mu\text{l}$  de plasma. Como se indicó anteriormente, volúmenes iguales (1 ml) de PPP desfibrinado (heparinizado, sin heparinizar y con o sin F4P) y fosfolípido procoagulante se mezclaron en tubos

de vidrio y atemperaron a 37°C durante 1 minuto, realizándose inmediatamente la recalcificación con 1ml de CaCl<sub>2</sub> 25mM. En cada ensayo se incluyeron controles de plasma en ausencia de HNF o HBPM y presencia de la concentración de F4P(R) a ensayar y a la inversa.

El porcentaje de neutralización de la actividad inhibitoria de generación de trombina de HNF y de las HBPM por F4P(R), se estimó a partir de la fórmula que se desarrolla en el siguiente apartado.

### **III.2.6 Neutralización de la actividad de heparina por F4P: Método de cálculo**

Para los estudios de neutralización por F4P se incluyeron en todos los ensayos una solución de heparina o de HBPM sin F4P que se valoró como 0% de neutralización, y una solución de F4P sin heparina que fue estimada para probar que el sistema no sería influido por las distintas concentraciones del F4P ensayado.

El porcentaje de neutralización por F4P a una concentración de heparina determinada se calculó a partir de la fórmula

$$\text{Neutralización (\%)} = \frac{b - a}{c - a} \times 100$$

donde a, b y c representan actividad biológica (densidad óptica o trombina generada) de HNF o de las HBPM, expresada como porcentaje del plasma control: a) en presencia de heparina y ausencia de F4P (0%); b) en presencia de heparina y de distintas concentraciones de F4P; c) en ausencia de heparina y de F4P (100%).

### III.2.7 Generación de Trombina en PRP

Las plaquetas activadas liberan una variedad de sustancias que incluyen el factor 5 de coagulación y el factor 4 plaquetario (F4P), una proteína que neutraliza heparina (Conley et al., 1948; Poplawski y Niewarowski, 1965; Brøedervøld et al., 1975; Dawes et al., 1978; Chesney et al., 1983). Por otro lado, la membrana de las plaquetas puede sufrir una reorganización transbicapa de sus fosfolípidos de forma que expone los fosfolípidos procoagulantes en la superficie de la célula intacta.

A efectos del ensayo de generación de trombina, estos fenómenos inducen tres diferencias principales con respecto al método aplicado en PPP. En los ensayos de generación de trombina en PRP los fosfolípidos serán aportados por estos elementos celulares, que a su vez liberarán al medio el F4P; la tercera diferencia con el ensayo de generación de trombina en PPP se refiere a la presencia de fibrina, ya que el plasma no puede ser previamente desfibrinado porque esto causaría la pérdida de plaquetas. Estos tres aspectos se han tomado en cuenta en el método que se describe a continuación.

#### **Reactivos**

#### PRP

Se utilizaron muestras de PRP obtenidas inmediatamente antes de cada ensayo, a partir de 33 donadores individuales en ayunas, con concentraciones de plaquetas en el rango de  $2.2 \times 10^9$  a  $5.3 \times 10^9$ . La preparación de PRP se ha descrito en la sección de Materiales (pág. 33).

### Recuento de plaquetas en las muestras de PRP

El recuento de plaquetas se determinó en un Contador Coulter. La calibración del instrumento se llevó a cabo utilizando un tubo de 70  $\mu\text{m}$  de apertura, de acuerdo con el procedimiento detallado en el manual de instrucciones del contador. Se utilizó también un control de trombocitos Coulter (CTC-3) como referencia para monitorizar la ejecución del contador día a día.

Se prepararon dos diluciones independientes 1/3000, tomando 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra de PRP en diluyente ISOTON II para obtener el recuento de células. Para cada uno de los duplicados se tomaron cuatro recuentos a partir de un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . La lectura en el contador del diluyente ISOTON II, utilizado como blanco de plaquetas, estuvo siempre por debajo del límite máximo establecido en las instrucciones del instrumento, en las condiciones de un volumen de muestra de 100  $\mu\text{l}$  y orificio de tubo de 70  $\mu\text{m}$ . La media de las lecturas del Contador Coulter en todas las muestras PRP ensayadas fue  $12527 \pm 2431$ . Tomando esta cifra como ejemplo, para una dilución de muestra de 1:3000, los cálculos para encontrar el número de plaquetas por ml de plasma se hicieron como sigue:

Número de células por muestra de 10  $\mu\text{l}$  (dilución 1/3000)

$$12527 \times 3 \times 10^3 = 3.8 \times 10^7$$

Número de células por mililitro de muestra

$$3.8 \times 10^7 \times 10^2 = 3.8 \times 10^9$$

### PPP

Se tomaron 9 ml de sangre de donadores individuales en ayunas, en 1

ml de citrato trisódico al 3.8%, en tubos de plástico. Una muestra semejante se había tomado de los mismos donadores para preparar PRP. La muestra de PPP se obtuvo por centrifugación a 20000 rpm durante 20 minutos.

### Fibrinógeno bovino

Dos lotes diferentes de fibrinógeno se incluyeron en estos experimentos, FN 119 y FN 121, utilizándose la misma concentración de fibrinógeno que en los ensayos de generación de trombina en PPP (2.4 mg/ml). El nuevo lote utilizado, FN 121, se calibró antes de su uso frente al 1<sup>er</sup> patrón internacional de  $\alpha$ -trombina, siguiendo el mismo método que el descrito para el lote FN119 (Método III.2.4, pág. 74).

### **Patrones y Muestras**

En estos experimentos se utilizaron concentraciones de heparina que variaron de 1 a 7  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, expresadas en términos de peso seco: 1 a 4  $\mu\text{g}$  para los patrones internacionales de HNF y HBPM, 2 a 5  $\mu\text{g}$  para FRG y LOG, 3 a 6  $\mu\text{g}$  para FRX, y 3 a 7  $\mu\text{g}$  para CLX. Al igual que en métodos anteriores, para obtener estas concentraciones en la mezcla final de plasma, se obtuvieron previamente diluciones de trabajo en un rango de concentración de 10 a 70  $\mu\text{g/ml}$  de TTS para cada preparación, a partir de las cuales se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para los ensayos. Se utilizó TTS para diluir todas las muestras de heparina y también como sustituto de fosfolípido en el ensayo.

### **Procedimiento**

La generación de trombina por la vía intrínseca se inició por contacto con una superficie de vidrio. La mezcla de reacción se preparó con 900  $\mu\text{l}$  de



PRP y 100  $\mu$ l de TTS con o sin heparina, a los que se añadieron 1000  $\mu$ l de TTS en lugar del fosfolípido utilizado en los ensayos de PPP. Después de un minuto de incubación a 37°C la formación de trombina se inició tras añadir 1000  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 25 mM.

Como el plasma no había sido desfibrinado, se introdujo al comienzo del ensayo un bastoncillo de madera en el tubo de vidrio. Tan pronto como se formó el coágulo de fibrina, éste se recogió en el bastoncillo y se extrajo. Una vez extraído, se valoraron 50  $\mu$ l de la mezcla de incubación en 200  $\mu$ l de fibrinógeno a intervalos de 15 seg. Esta valoración se realizó cada 30 seg en la caída de la curva de generación de trombina, una vez que la lectura de los tiempos de coagulación superara los 30 segundos.

Las muestras de PRP se mantuvieron a temperatura ambiente durante el ensayo y se utilizaron durante un máximo de dos horas.

### Cálculos

La relación de los tiempos de coagulación obtenidos para cada intervalo de submuestreo se utilizó para calcular la cantidad de trombina (UI/ml) generada en cada ensayo. El cálculo se efectuó por comparación con las curvas patrón trombina-fibrinógeno previamente establecidas en la calibración de los lotes de fibrinógeno utilizado en los ensayos. En todos estos experimentos, la actividad de generación de trombina del plasma heparinizado, ya sea en presencia de HNF o HBPM, se comparó con la trombina generada en plasma normal en el que el contenido de heparina se había sustituido por TTS (control de plasma). La generación de trombina en ausencia de heparina se tomó como 100 %.

El total de generación de trombina se valoró, como en el método de generación de trombina en PPP (pág. 76), calculando el área bajo la curva así como en base a la concentración máxima de trombina producida en cada ensayo.

### III.2.8 Modelo de Trombosis por Estasis Venosa en Conejo

El método utilizado corresponde a un modelo de Wessler modificado. El modelo experimental, introducido por Wessler et al. (1959, 1962), produce trombos venosos por un mecanismo que es consistente con las actuales teorías de la patogénesis de trombosis venosa. Los modelos que utilizan estímulos basados sobre un extenso daño de la pared vascular, por ejemplo, no son válidos para el estudio de trombogénesis venosa ya que no existe evidencia de que tal mecanismo patogénico sea relevante para la mayoría de los casos de trombosis venosa humana (Thomas, 1988).

Una modificación del modelo de Wessler en el conejo fue introducida por Thomas et al. (1989a), al incluir un período de 20 minutos de estasis en una vena yugular, además de los usuales 10 minutos en la otra vena. Previamente se había determinado (Aronson y Thomas, 1985) que existe una correlación lineal entre la intensidad del estímulo trombogénico, la duración de estasis y la producción de trombos venosos.

El período de 20 minutos de estasis en una vena yugular se consideró de relevancia particular en el contexto de esta tesis, ya que Thomas et al. (1989b), habían demostrado diferencias significativas en la prevención de trombosis, para la misma dosis de un glicosaminoglicano relacionado (Dermatan Sulfato), cuando los resultados de estasis se analizaron a 10 y 20 minutos.

## Muestras

Se incluyeron en el estudio muestras de HNF(PI) y de las cuatro HBPM comerciales (FRG, LOG, FRX y CLX). Para mayor claridad, la secuencia de dosis aplicada en el conejo se ha incluido en su sección de resultados (sec. IV.6, pág. 173).

## Procedimiento

El estudio de la actividad antitrombótica de heparinas se llevó a cabo en conejos blancos New Zealand cuyos pesos individuales se determinaron inmediatamente antes del experimento. Cinco conejos blancos Nueva Zelanda se utilizaron para cada una de las dosis valoradas. El diseño original de seis conejos por dosis no se alcanzó a causa de un fallo para producir trombosis en un lote de conejos. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.44 ml/kg) administrado por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja. La administración se realizó a través de un equipo de venoclisis apropiado (Butterfly 21 ó 23) que se aseguró con cinta adhesiva en la oreja del conejo. El anestésico se lavó con solución salina. Una vez comprobado que el conejo estaba totalmente anestesiado se rasuró el área del cuello para comenzar la disección.

En las venas yugulares de cada conejo se aisló bilateralmente una longitud de 2 a 3 cm y se situaron ligaduras flojas en posiciones proximal y distal (fig. 3A). Una cánula prellenada con solución salina se aplicó a la arteria carótida izquierda (fig. 3B) para recoger muestras de sangre a lo largo del experimento.

Previamente a la administración de cada uno de los preparados se

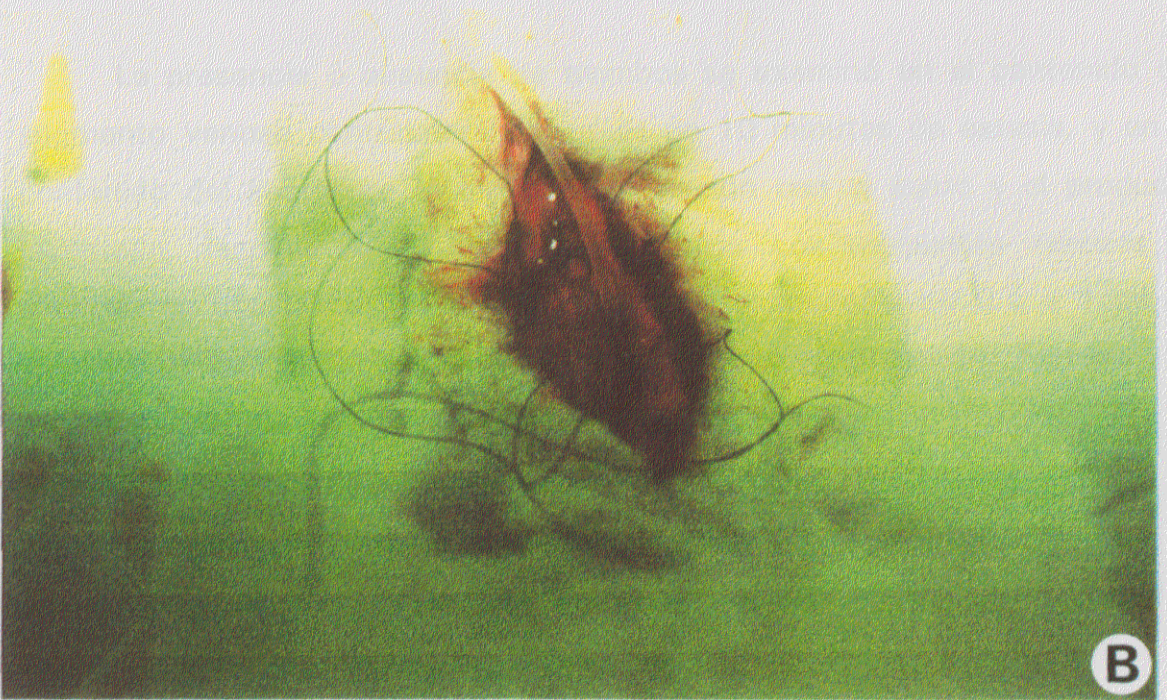
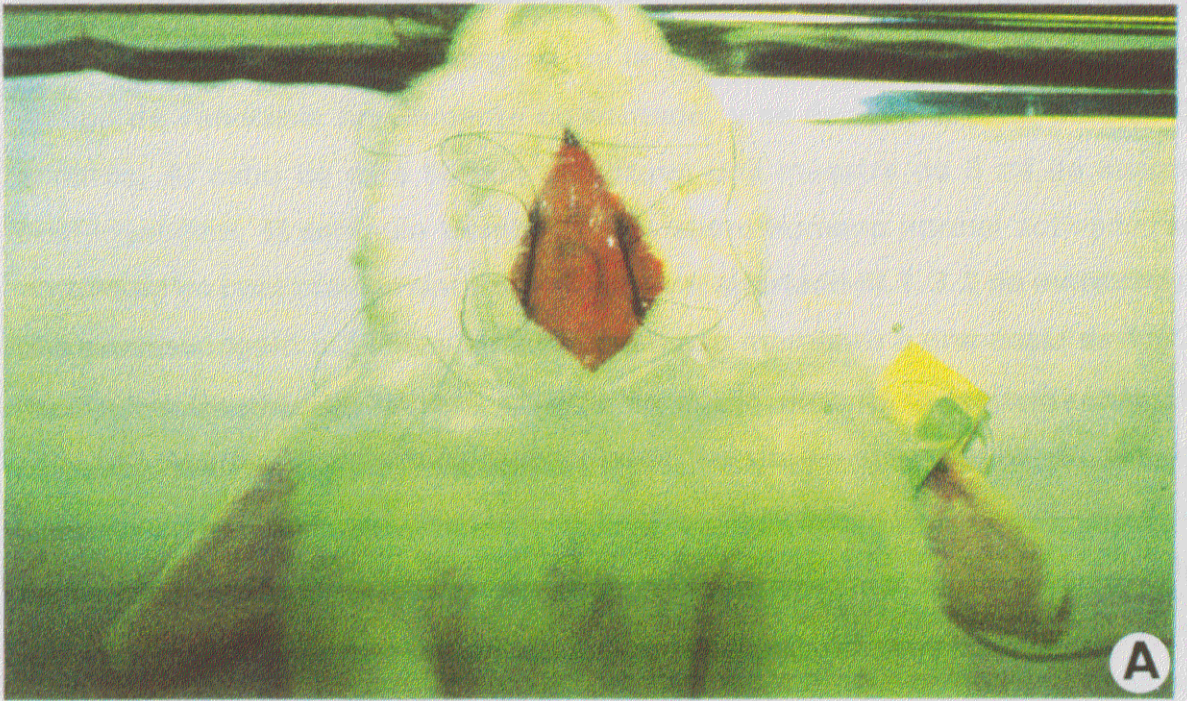


Figura 3

tomaron muestras de 5 ml de sangre en citrato trisódico 3.8% (9:1 sangre/citrato) como control. Se inyectó solución salina o el potencial agente antitrombótico en la vena marginal de la oreja durante 15 seg, a través del equipo de venoclisis previamente comentado, y se dejaron circular durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo se obtuvo una muestra de 3 ml de sangre post-inyección. El estímulo trombogénico, suero humano normal activado, se obtuvo de un pool previamente preparado (ver apartado III.1.3.2 de materiales) que se descongeló a 37°C y se inyectó en ese momento a una dosis de 1.32 ml por kilo de peso de conejo, igualmente por la vena de la oreja durante 15 seg. Los segmentos aislados previamente en cada vena yugular se ataron después de otros 15 seg, comenzando por el extremo distal con respecto a la cabeza del conejo. El segmento contralateral, en relación con la inyección de suero y preparación a investigar, se llenó de sangre y el extremo proximal se obturó. El mismo procedimiento se realizó con el lado opilateral. Las pinzas se retiraron una vez que las ligaduras proximales se suturaron. Durante el experimento se cubrió la herida con una gasa humedecida en solución salina.

La presencia o ausencia de trombos se examinó en el contenido del segmento venoso contralateral, después de 10 minutos de estasis, y en el contenido del segmento ipsilateral en relación con el suero y el producto inyectado, después de 20 minutos de estasis. Los segmentos venosos se abrieron en una placa petri que contenía aproximadamente 0.5 a 1 ml de solución salina. La formación de trombos inducida por suero humano, se analizó sobre una escala de 0 a 4, como sigue (fig. 4):

- 0 : Sangre completamente fluida
- 1 a 3 : Trozos de coágulos de fibrina progresivamente grandes
- 4 : Oclusión completa del segmento

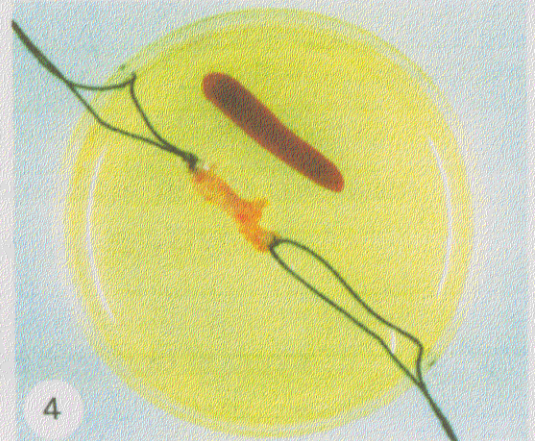
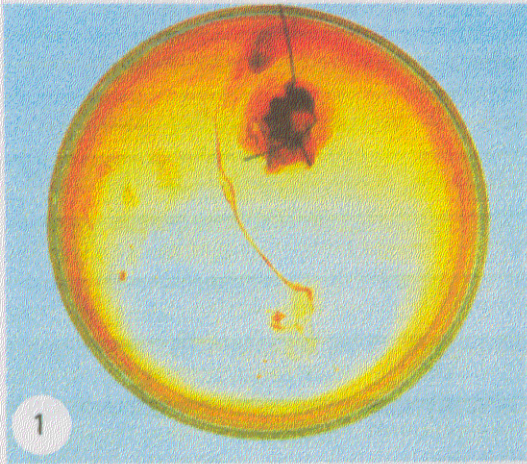
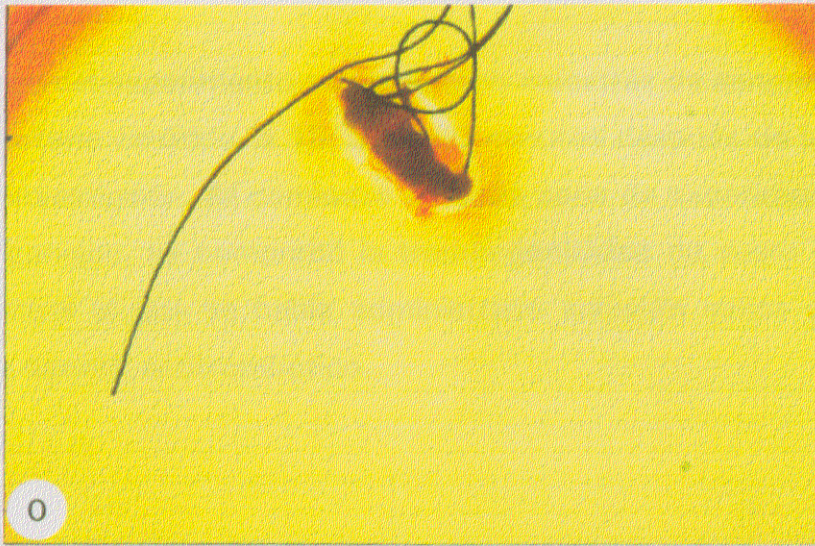


Figura 4

A lo largo del experimento se recogieron muestras de sangre a partir del catéter de la arteria carótida, a 15, 30 y 60 minutos después de la inyección del producto investigado. Al comienzo de cada serie de experimentos y para cada lote de conejos, se comprobó la trombogenicidad de suero humano en un conejo control al que se había administrado solución salina en lugar de cualquier otro agente antitrombótico.

### **Cálculos**

Los resultados se calcularon tomando la media de los datos de trombosis obtenidos para cada dosis, según la escala indicada, siendo el máximo valor individual 4. Asimismo como porcentaje del máximo valor posible de obtener para los 5 conejos estudiados, que es 20. La potencia de cada HBPM estudiada en el modelo de trombosis venosa se calculó frente a HNF(PI) mediante un análisis de varianza basado en un método de líneas paralelas (Finney, 1978; European Pharmacopoeia, 1993b). Esta condición se aplicó sobre una representación del logaritmo de la concentración de HNF o HBPM frente a porcentaje de trombosis o prevención de trombosis.

### **III.2.9 Análisis Estadísticos**

Se utilizaron cuatro tipos de programas informáticos para la aplicación de los análisis estadísticos necesarios a lo largo de esta investigación:

#### **Programa informático para determinación del área bajo la curva:**

Diseñado por la División de Estadística del NIBSC para su uso en los ensayos de generación de trombina. Utiliza un procedimiento del programa estadístico SAS para calcular y representar el área bajo las curvas de

generación de trombina. El programa fue instalado en un ordenador personal IBM que disponía de los módulos SAS-Base y SAS-Graph necesarios.

El programa recibe los datos como tiempos de coagulación, correspondientes a los tiempos de lectura de los mismos en un ensayo de generación de trombina. Transforma estos tiempos de coagulación en unidades de trombina frente a una curva de calibración previamente establecida, que procede a su vez de la valoración del fibrinógeno utilizado en los ensayos de generación de trombina frente a un patrón internacional de trombina. Finalmente dibuja la curva de trombina producida y calcula el área bajo esta curva para cada ensayo.

#### Programa informático de análisis de la varianza:

Diseñado por la División de Estadística del NIBSC para su aplicación en el método de líneas paralelas en ensayos biológicos. El programa calcula las rectas de regresión correspondientes a dos o más preparaciones (patrón y muestra/s problema), sobre una representación del logaritmo de la concentración frente a la respuesta o del logaritmo de la concentración frente al logaritmo de la respuesta. Seguidamente, realiza un análisis de la varianza para determinar si se validan las condiciones requeridas de regresión, linealidad y paralelismo. En caso afirmativo, se calcula la potencia relativa de la recta problema respecto a la recta patrón y su intervalo de confianza.

#### Programa informático de combinación de potencias:

Cuando varios ensayos han originado distintas estimaciones de una potencia, este programa calcula una única valoración y sus límites de confianza. Tiene en cuenta para ello, la precisión de cada estimación (peso



estadístico) y la homogeneidad o heterogeneidad de las estimaciones.

Este programa, al igual que el anterior, fue instalado en un ordenador personal IBM para su uso en la validación de ensayos biológicos. El fundamento de la metodología estadística y de cálculo aplicado en los programas referidos puede encontrarse en Finney, 1978.

#### Programa informático de cálculo de correlaciones:

Para la estimación de correlaciones entre dos series de datos se utilizó el programa BMDP6D. Calcula el valor de la correlación  $R$  y realiza un test estadístico para contrastar la hipótesis  $R=0$ . El rechazo de la hipótesis ( $p < 0.05$ ) significa que se acepta la correlación entre las variables comparadas.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV.1 CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* DE LAS HBPM COMERCIALES

Esta sección recoge los resultados analíticos correspondientes a las actividades anticoagulantes anti-factor Xa y anti-factor IIa de las HBPM objeto de esta investigación (FRG, LOG, FRX, CLX), así como los valores obtenidos en la determinación de la distribución de su tamaño molecular.

### IV.1.1 Actividades Específicas Anti-Xa y Anti-IIa

La capacidad de las cuatro HBPM comerciales ya enunciadas para potenciar la inactivación de trombina y factor Xa *in vitro* se valoró en ensayos amidolíticos frente al patrón internacional de HBPM, utilizando ya sea un sistema purificado con ATIII o plasma, a los que se añadió el factor de coagulación activado. Los sustratos sintéticos S-2238 y S-2765 fueron adicionados en cada caso. Las particularidades de los métodos utilizados así como la preparación de los reactivos se han descrito en detalle en los apartados correspondientes a metodología (págs. 57 y 65).

El principio básico de la medida de potencia de las HBPM es, como para otros productos biológicos, comparar las curvas dosis-respuesta de la preparación problema y del patrón. La asunción fundamental de la estimación de potencia es que la preparación problema se comporte exactamente como una dilución del patrón. Esta asunción se comprobó en cada ensayo utilizando un análisis estadístico basado en el método de líneas paralelas. Las tablas 3 a) y b) muestran los valores de potencia de las HBPM comerciales objeto de estudio, cuando se analizaron en ensayos amidolíticos anti-factor Xa. Las tablas 4 a) y b) recogen los valores de actividad anti-IIa, igualmente en ensayos amidolíticos, para las mismas preparaciones.

**ENSAYOS AMIDOLÍTICOS ANTI-X<sub>a</sub> DE HBPM COMERCIALES**

a)	Número de ensayos	Potencia UI/ml	Peso	gl
FRAGMIN	1	21991	2802	8
	2	22116	2073	8
LOGIPARIN	1	10935	4642	7
	2	11185	2042	8
FRAXIPARINA	1	9747	2029	6
	2	9401	6620	8
CLEXANE	1	9809	14811	8
	2	9994	2489	8
<b>Medidas Ponderadas (<math>p &gt; 0.05</math>)</b>				
b)	Potencia UI/ml	Intervalo de confianza	Peso	P
FRAGMIN	22044	20556-23640	4874	0.7086
LOGIPARIN	11011	10369-11692	6685	0.9325
FRAXIPARINA	9481	8991- 9998	8649	0.5367
CLEXANE	9835	9477-10207	17300	0.7112

Tabla 3. a) Valores de potencia obtenidos en dos ensayos anti-factorX<sub>a</sub> independientes, realizados sobre dos ampollas frescas de cada una de las preparaciones reseñadas. Se indican igualmente el peso estadístico y el número de grados de libertad (gl) para cada ensayo.

b) Potencias combinadas de los dos ensayos incluidos en tabla 3a. Se indican intervalo de confianza, peso estadístico y probabilidad obtenidos para cada combinación.

### ENSAYOS AMIDOLÍTICOS ANTI-IIa DE HBPM COMERCIALES

a)	Número de ensayos	Potencia UI/ml	Peso	gl
FRAGMIN	1	9864	19118	8
	2	9722	12160	8
LOGIPARIN	1	7664	14496	7
	2	7328	8544	8
FRAXIPARINA	1	2623	8066	6
	2	2752	4956	8
CLEXANE	1	2455	2235	8
	2	2569	1697	8
<b>Medidas Ponderadas (<math>p &gt; 0.05</math>)</b>				
b)	Potencia UI/ml	Intervalo de confianza	Peso	P
FRAGMIN	9809	9542 - 10083	31278	0.5858
LOGIPARIN	7376	7024 - 7745	9993	0.4926
FRAXIPARINA	2672	2560 - 2788	13023	0.2468
CLEXANE	2504	2316 - 2708	3932	0.5408

Tabla 4. a) Valores de potencia obtenidos en dos ensayos anti-factor IIa independientes, realizados sobre dos ampollas frescas de cada una de las preparaciones reseñadas. Se indican igualmente el peso estadístico y el número de grados de libertad (gl) para cada ensayo.

b) Potencias combinadas de los dos ensayos incluidos en tabla 4a. Se indican intervalo de confianza, peso estadístico y probabilidad obtenidos para cada combinación.

Las actividades específicas anti-Xa y anti-IIa de las HBPM estudiadas en los dos sistemas de ensayo se muestran en la tabla 5. Estas actividades se calcularon dividiendo los valores de potencia obtenidos por los valores de concentración p/v (mg/ml) dados por los fabricantes para cada una de las preparaciones.

#### ACTIVIDADES ESPECÍFICAS ANTI-Xa Y ANTI-IIa DE LAS HBPM

	Anti-Xa UI/ml	Anti-IIa UI/ml	Peso mg/ml	Actividad Específica		aXa/alla
				UI/mg aXa	UI/mg alla	
HNF (4° PI)	-	-	-	193	193	1.0
HBPM (1° PI)	-	-	-	168	67	2.5
FRAGMIN	22044	9809	170	130	58	2.2
LOGIPARIN	11011	7376	140	79	53	1.5
FRAXIPARINA	9481	2672	100	95	27	3.5
CLEXANE	9835	2504	100	98	25	3.9

Tabla 5. Relación de las actividades específicas anti-Xa y anti-IIa de las HBPM comerciales analizadas, en comparación con los valores establecidos para los patrones internacionales de HNF y HBPM.

Como puede observarse en esta tabla, las actividades biológicas varían considerablemente dentro del grupo de las HBPM estudiadas. Fragmin es la preparación con actividad específica más elevada, para las dos actividades anti-factor Xa y anti-factor IIa analizadas. Logiparin presenta una actividad anti-factor IIa relativamente alta, si bien su actividad anti-Xa es la más baja de las HBPM estudiadas. La relación entre las actividades anti-factor Xa y anti-factor IIa varía desde 1.5 para Logiparin a casi 3.9 para Clexane. Aunque los valores incluidos en las tablas 3 a 5 corresponden a un lote de cada HBPM, en el curso de la investigación se utilizaron dos lotes de Clexane y Fragmin, y ambos mostraron idéntica actividad *in vitro*. Por consiguiente las actividades específicas permanecieron constantes.

Cuando los valores de actividad obtenidos para las HBPM comerciales se compararon con los datos establecidos para los patrones internacionales de HNF y HBPM en los estudios de colaboración internacionales (Thomas et al., 1984; Barrowcliffe et al., 1988), se observó que excepto para las actividades anti-factor Xa de Fragmin y HBPM (PI), todas las actividades específicas de las HBPM son bajas comparadas con HNF (tabla 5). Se destaca asimismo la semejanza de datos entre HBPM (PI) y Fragmin, siendo la relación aXa/alla de 2.5 y 2.2 respectivamente. Ello se explica porque el proceso de producción de HBPM (PI) es básicamente el mismo que para Fragmin.

#### **IV.1.2 Distribución del Tamaño Molecular**

La determinación del rango de pesos moleculares de las HBPM comerciales se llevó a cabo mediante un método de cromatografía de exclusión molecular de alta eficacia (ver métodos pág. 45), que se fundamenta en la disponibilidad de patrones adecuados de peso molecular. La figura 5 muestra los perfiles de la distribución de tamaño molecular para las cuatro HBPM comerciales, en comparación con HNF. Cada pico en el cromatograma representa un disacárido con una masa molecular asumida de 600 Da. Es decir que la mayor parte de las moléculas en estas HBPM se encuentran en el rango de 1500 a 8000 Da. Sin embargo el patrón internacional de HNF presenta una masa molecular media de alrededor de 13000 Da. Los cromatogramas muestran asimismo que Fragmin y Logiparin tienen relativamente altas cantidades de moléculas de alto peso molecular mientras que Clexane y Fraxiparina tienen mayor proporción de moléculas de bajo peso molecular.

Además del perfil de la distribución del tamaño molecular, resulta muy informativo obtener una indicación de la fracción de muestra por encima y por debajo de determinados límites; por ejemplo 3000 y 8000 daltons. La tabla 6

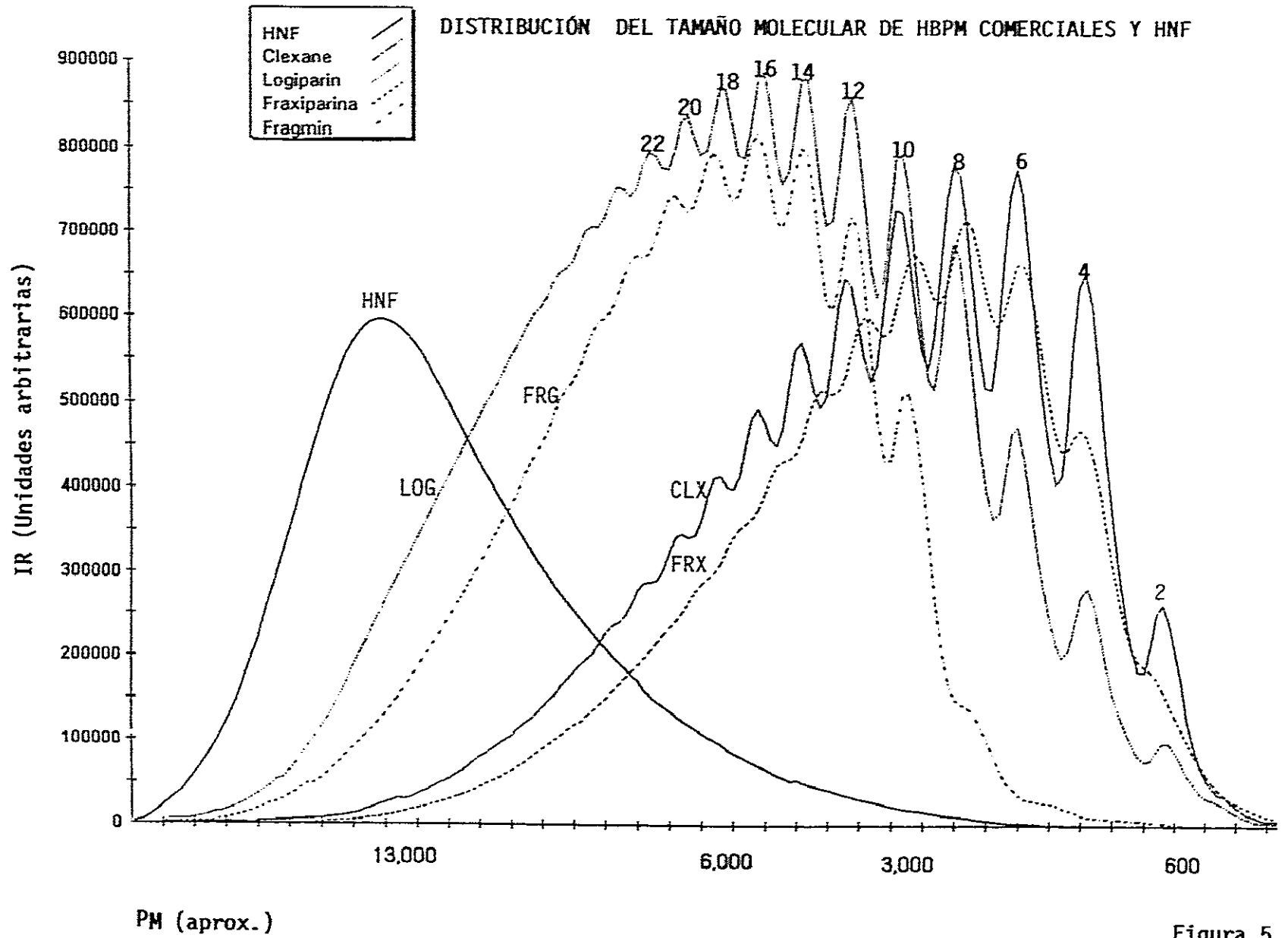


Figura 5



recoge los porcentajes de moléculas encontrados en estos rangos de peso molecular para cada HBPM y también del número de moléculas superior a 18 monosacáridos. Estos parámetros tomados juntos serán suficientes para distinguir las HBPM entre sí, cuando responden a procesos de fabricación diferentes.

#### DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR DE HNF Y HBPM COMERCIALES

	% Moléculas			
	< 3000 D	3000-8000 D	> 8000 D	> 18 sacáridos
FRAGMIN	5	75	20	55
LOGIPARIN	15	55	30	55
FRAXIPARINA	25	65	10	50
CLEXANE	35	55	10	30
HNF (PI)	-	-	-	95

Tabla 6. Porcentaje de moléculas obtenido en los intervalos de 3000 a 8000 Da, o inferiores o superiores a 3000 y 8000 Da, para cada una de las HBPM analizadas. Se indica asimismo el porcentaje de moléculas de longitud superior a 18 sacáridos (5400 Da) en comparación con HNF.

#### IV.1.3 Discusión

Una de las principales características de las actividades anticoagulantes de las HBPM es que cuando se comparan con HNF, su actividad anti-Xa es superior a la encontrada en ensayos anti-IIa. Sin embargo, cuál de éstas dos actividades es más importante para su acción antitrombótica *in vivo* es aún un tema de debate. Es por consiguiente esencial valorar cada HBPM por al menos un método de cada uno de estos dos grupos de ensayos, y la relación anti-Xa/anti-IIa puede ser considerada como una "huella" para cada producto, que debe permanecer dentro de límites estrechamente definidos.

Como se desprende de los análisis expuestos, las HBPM tienen todas características *in vitro* diferentes así como distinta distribución del tamaño molecular, aunque están más estrechamente relacionadas entre sí que con su progenitor convencional, la HNF. Si relacionamos los resultados del ensayo de distribución del tamaño molecular con los obtenidos al valorar las actividades anti-Xa y anti-IIa de las mismas preparaciones, se puede observar que FRX y CLX que presentan un valor del cociente aXa/IIa más alto que FRG y LOG, contienen también una mayor proporción de moléculas por debajo de 18 monosacáridos. Al revés, FRG y LOG que muestran una actividad anti-IIa superior a FRX y CLX, contienen un porcentaje de moléculas por encima de 18 monosacáridos superior a FRX y CLX. La relación aXa/IIa para Logiparin es la menor encontrada, lo que podría explicarse asimismo por la mayor proporción de moléculas de alto peso molecular que contiene esta preparación.

Estas diferencias en la distribución del tamaño molecular son entonces la causa predominante de las diferencias que muestran estas preparaciones en sus actividades. Sin embargo, la relación entre las potencias *in vitro* de las HBPM y su efecto antitrombótico clínico es de difícil comprensión. Qué proporción de la actividad anti-Xa de las HBPM o HNF contribuye a la inhibición o supresión de generación de trombina en plasma y cómo de diferente puede ser el comportamiento de estos preparados en un ensayo de generación de trombina fue objeto de la experimentación desarrollada subsiguientemente y los resultados se exponen en las sucesivas secciones de esta memoria.

## IV.2 INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA POR HNF Y HBPM EN PPP

Los experimentos relacionados con la expresión de las actividades anti-Xa y anti-IIa de la HNF y las diversas HBPM se llevaron a cabo ya sea en un sistema purificado, conteniendo el factor de coagulación activado y ATIII (ensayos anti-IIa), o en plasma al que se añadió HNF o HBPM y el factor de coagulación activado (ensayos anti-Xa). Sin embargo, si se considera que la capacidad terapéutica de la heparina responde a su acción sobre el sistema de la coagulación, un ensayo de generación de trombina en plasma total puede estimarse más representativo de la situación *in vivo*, siendo además la característica común de la terapia farmacológica antitrombótica conocida hasta el momento.

El objetivo de este estudio, por consiguiente, fue primero comparar la capacidad de las HBPM y HNF para inhibir la generación de trombina en PPP y segundo, analizar la relación entre la inhibición de generación de trombina y la actividad obtenida en ensayos amidolíticos de inhibición de factor Xa y factor IIa.

### IV.2.1 Curva Trombina-Fibrinógeno

El lote de fibrinógeno FN119, utilizado en los experimentos de generación de trombina en PPP, se calibró frente al 1<sup>er</sup> Patrón Internacional de Trombina (70/157) para conocer la correspondencia entre tiempos de coagulación y unidades de trombina. La figura 6 muestra la curva de calibración obtenida cuando se combinaron los resultados de los tiempos de coagulación de dos ensayos y se representaron frente a las unidades internacionales de trombina en un sistema log-log. Se calcularon la pendiente

**CURVA TROMBINA-FIBRINOGENO**  
**Fibrinógeno (Lote 119)/Trombina (1er PI)**

**T<sub>9</sub> de Coagulación (seg)**

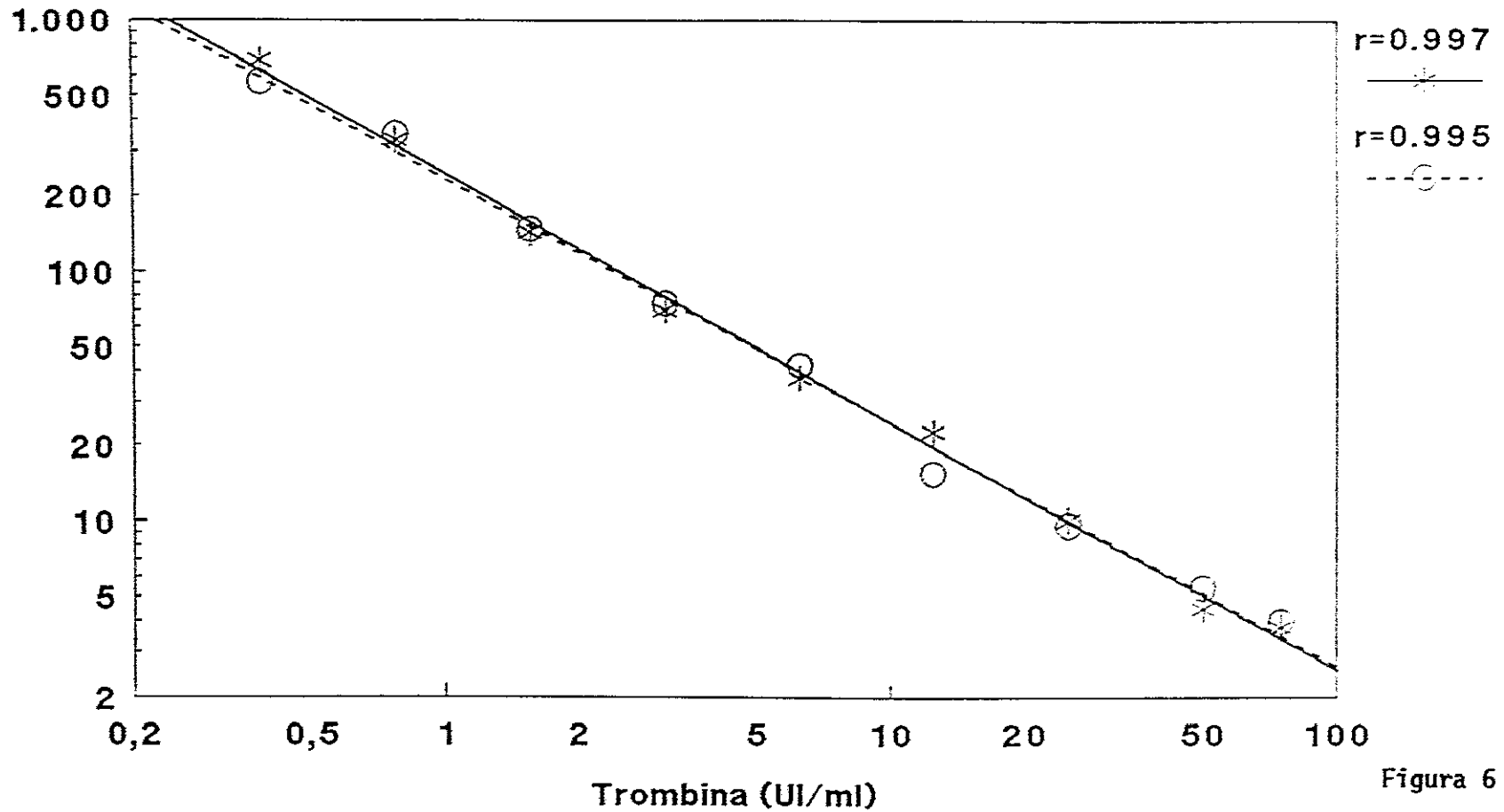


Figura 6

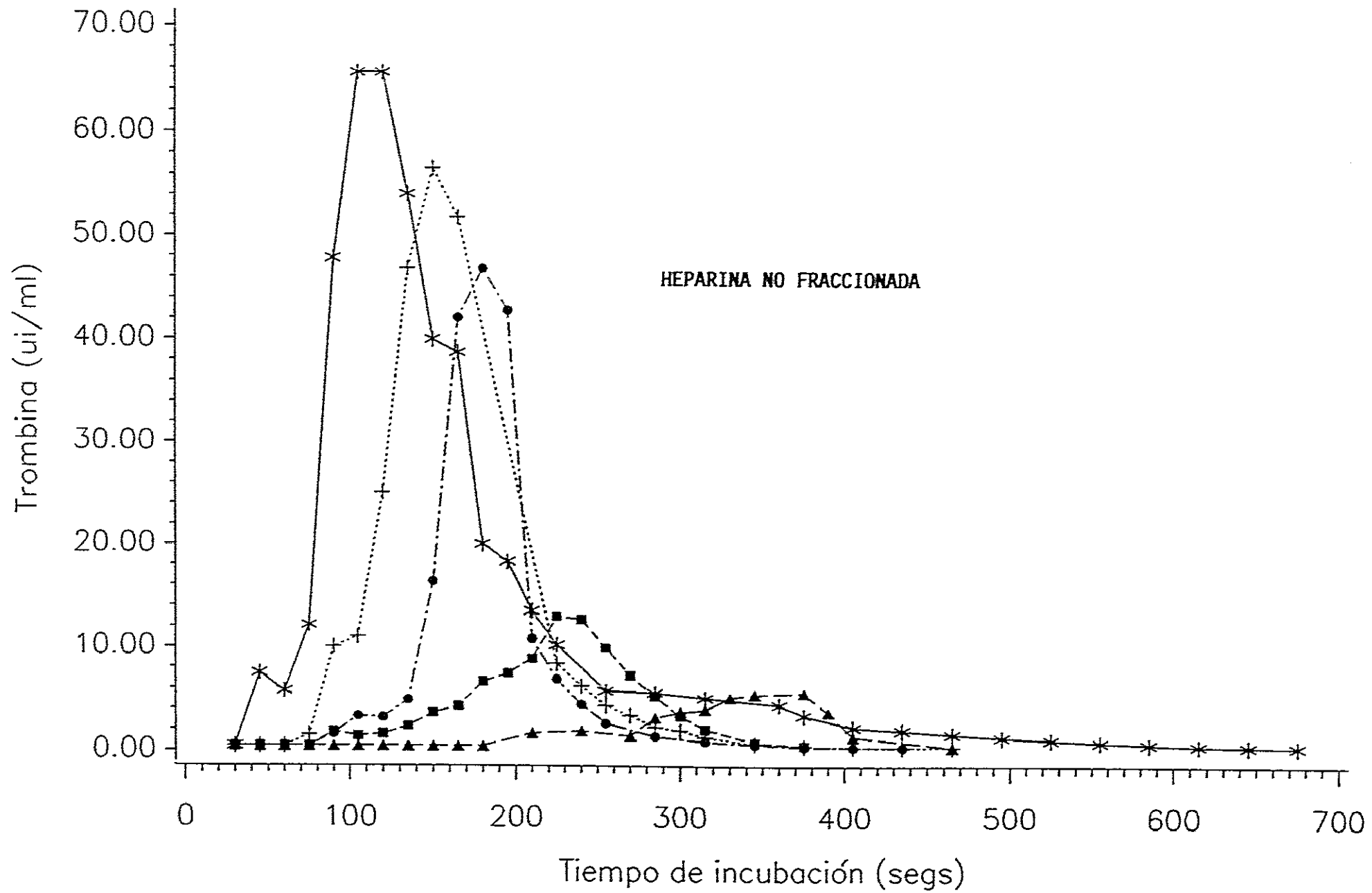
y la intersección con el eje de ordenadas de esta curva, resultando los valores -0.96999 y 2.35356 respectivamente; ambos datos se utilizaron en un programa informático para calcular las unidades de trombina producida en aquellos ensayos de generación de trombina en los que se había incluido el lote FN119 de fibrinógeno.

#### IV.2.2 Inhibición de generación de trombina por HNF(PI)

La figura 7 muestra una curva típica de generación de trombina en PPP, junto con los efectos de distintas concentraciones de HNF. En ausencia de heparina, el comienzo de la generación de trombina fue rápido, alcanzando un máximo de alrededor de 65 UI a aproximadamente 105 segundos, seguido de una lenta disminución de la trombina producida. Cuando se añadieron concentraciones de HNF cada vez mayores hubo una marcada inhibición de la generación de trombina, así como un retraso progresivo en la aparición de la concentración máxima de trombina, lo que consecuentemente se manifestó por la reducción tanto del área bajo la curva como de la concentración del pico de trombina inicialmente obtenido.

La tabla 7 muestra los resultados correspondientes a la relación dosis-respuesta de HNF, en términos del área bajo la curva y de la concentración máxima de trombina producida, expresados como porcentaje de los valores obtenidos para el plasma control que fue estimado como 100%. La media de los valores máximos de trombina obtenidos para el plasma control en estos ensayos fue  $64.6 \pm 1.2$  UI/ml. Un mínimo de tres ensayos se realizó en todos los casos para cada una de las concentraciones de HNF valoradas. Esto puede aplicarse igualmente para todos los resultados que se muestran en esta sección.

HEPARINA NO FRACCIONADA



--\*-- PPP --+-- PPP + HNF 0.25 ug --●-- PPP + HNF 0.5 ug --■-- PPP + HNF 1 ug --▲-- PPP + HNF 2 ug

Figura 7

## EFFECTO DE HNF SOBRE LA GENERACIÓN DE TROMBINA EN PPP

HNF $\mu\text{g/ml}$	Area Curva Trombina %	Pico de trombina %
0.25	63.5 $\pm$ 3.6	89.7 $\pm$ 3.2
0.5	34.0 $\pm$ 2.9	57.0 $\pm$ 5.0
1.0	18.7 $\pm$ 1.4	23.6 $\pm$ 2.6
2.0	9.8 $\pm$ 2.3	8.3 $\pm$ 0.3

Tabla 7. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de los resultados obtenidos para cada concentración valorada de HNF.

### IV.2.3 Inhibición de generación de trombina por HBPM(PI)

Cuando se realizó un estudio similar para establecer una curva dosis-respuesta del patrón de HBPM, analizando un rango de concentraciones de 0.5 a 4  $\mu\text{g}$  de HBPM por ml de plasma, se encontró que la acción inhibitoria de esta preparación sobre la trombina generada por el plasma control era mucho menor que en el caso de la HNF. La figura 8 indica un ejemplo de las curvas dosis-respuesta obtenidas y la tabla 8 presenta los datos que soportan estas curvas para las distintas concentraciones del patrón de HBPM valoradas.

### INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA INDUCIDA POR HBPM(PI)

HBPM $\mu\text{g/ml}$	Area Curva Trombina %	Pico de trombina %
0.5	57.0 $\pm$ 2.6	89.3 $\pm$ 0.2
1.0	32.7 $\pm$ 3.4	73.8 $\pm$ 5.4
2.0	20.0 $\pm$ 1.4	45.7 $\pm$ 4.1
4.0	11.0 $\pm$ 0.0	18.1 $\pm$ 3.7

Tabla 8. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de los resultados obtenidos para cada concentración valorada de HBPM.

HEPARINA DE BAJO PESO MOLECULAR

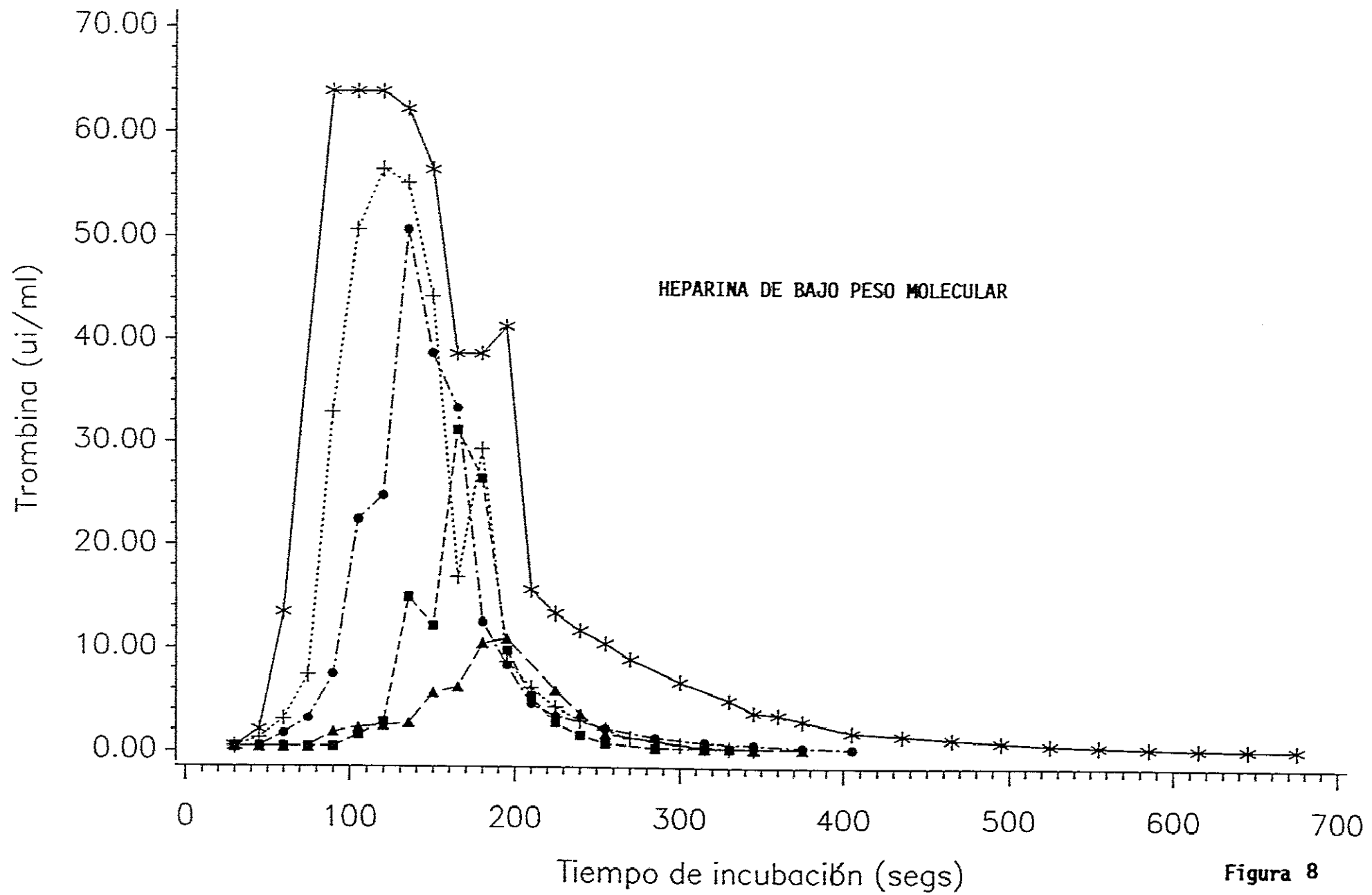


Figura 8



Al igual que en el caso de HNF, en la tabla se indican los porcentajes del área bajo la curva de trombina y de la concentración máxima de trombina obtenidos para cada concentración de HBPM (PI) respecto al plasma control. La media de los valores máximos de trombina encontrados para el control de plasma fue de  $64.8 \pm 1.6$  UI/ml en estos ensayos.

#### IV.2.4 Comparación de los efectos de HNF(PI) y HBPM(PI)

Dos efectos del diferente comportamiento de los patrones de HNF y HBPM pueden observarse en la fig. 9, que compara una misma concentración de HNF y de HBPM ( $1 \mu\text{g/ml}$ ): HNF produce mayor inhibición del pico de trombina y un mayor retraso en su aparición (de 150 seg a 225 seg) que el patrón de HBPM. Los resultados de varios experimentos, analizando las preparaciones referidas a la concentración de  $1 \mu\text{g/ml}$ , se recogen en tabla 9.

#### PORCENTAJE DE GENERACIÓN DE TROMBINA ( $1 \mu\text{g/ml}$ )

	Area Curva Trombina %	Pico de Trombina %
HNF (n = 6)	$19 \pm 1.4$	$24 \pm 2.6$
HBPM (n = 3)	$33 \pm 3.4$	$74 \pm 5.4$

Tabla 9. La inhibición del máximo de trombina y del área bajo la curva se expresan en porcentaje de trombina generada, respecto a los valores encontrados para el control de plasma. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar del número de experimentos realizados (n).

Para HNF, el grado de inhibición encontrado fue similar cuando se medía el área bajo la curva o el máximo de trombina generada; sin embargo en el caso de HBPM, la inhibición del máximo de trombina fue mucho menor que la

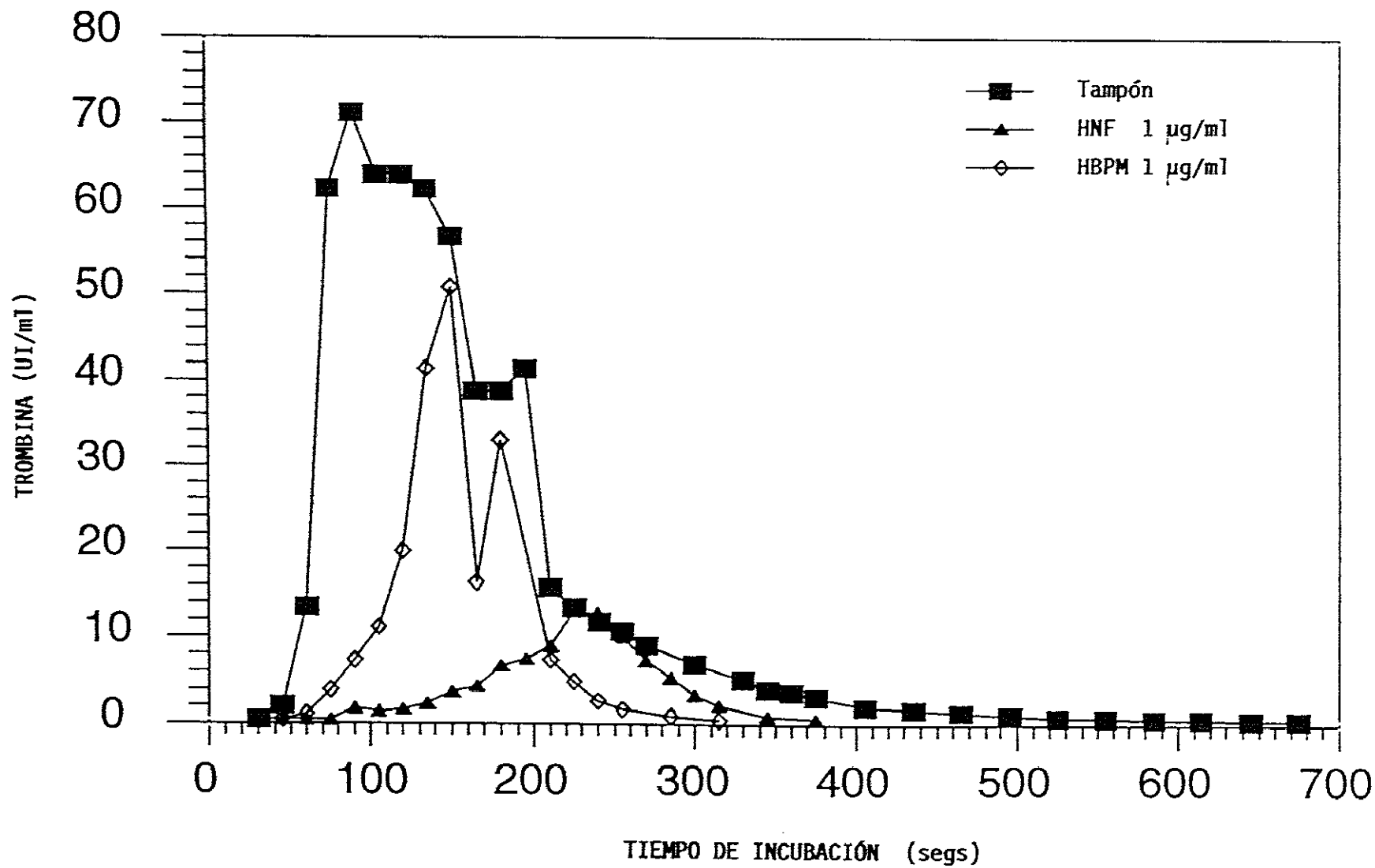


Figura 9

inhibición medida en términos del área de la curva de trombina. Como la evaluación de la máxima concentración de trombina generada depende de un único valor, el área bajo la curva se consideró una medida más fiable ya que analiza el curso de producción de trombina durante un período de tiempo.

Los valores dosis-respuesta para la inhibición de generación de trombina por HNF(PI) y HBPM(PI), calculados como porcentaje del área bajo la curva, se representaron en un sistema log-log (fig. 10) que muestra una relación lineal exacta para cada una de las preparaciones ensayadas y el paralelismo de las dos rectas, indicando un mecanismo de acción similar para ambos materiales. A partir de estas rectas se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de las dos preparaciones, expresándola como CE50 (concentración eficaz 50 %), esto es, la cantidad de HNF o HBPM requerida para alcanzar el 50% de inhibición de generación de trombina, que correspondió a 0.33  $\mu\text{g/ml}$  para HNF y 0.60  $\mu\text{g/ml}$  para HBPM.

La cuantificación de la actividad como CE50 se realizó también a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas con las concentraciones del pico de trombina (tablas 7 y 8) observado para cada concentración de HNF(PI) y de HBPM(PI). Para el HNF(PI) el valor de CE50 encontrado fue similar al obtenido en términos del área de la curva de trombina, 0.34  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, en el caso de HBPM(PI), el valor de CE50 fue superior al obtenido cuando se analizaron los datos del área bajo la curva, 0.92  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores dosis-respuesta se representaron en un sistema semilogarítmico que se presenta en el gráfico de la fig. 16 con el resto de las preparaciones estudiadas.

#### **IV.2.5 Inhibición de generación de trombina por HBPM Comerciales**

La inhibición de generación de trombina por las cuatro HBPM

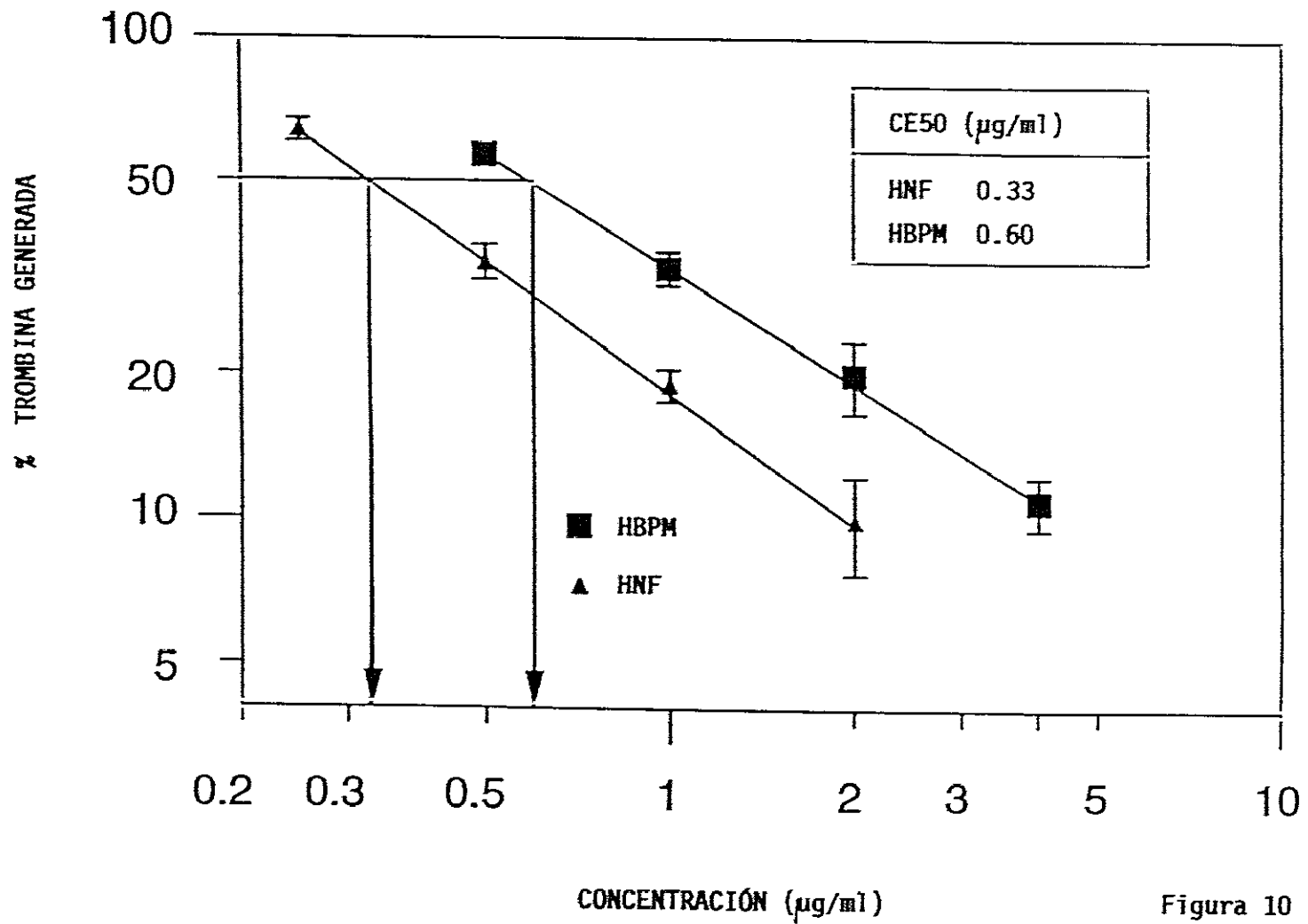


Figura 10

comerciales (FRG, LOG, FRX y CLX) se cuantificó también en términos del porcentaje del área bajo la curva de trombina y del porcentaje del pico de trombina, con respecto al plasma control. La media de los máximos de trombina (UI/ml) para el plasma control en cada serie de experimentos fue:  $60.09 \pm 2.02$  (FRG);  $61.23 \pm 3.83$  (LOG);  $61.00 \pm 3.15$  (FRX) y  $60.23 \pm 2.4$  (CLX).

Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran un modelo de las curvas analizadas para cada una de las HBPM, a las diferentes concentraciones estudiadas. Los datos obtenidos para las curvas dosis-respuesta desarrolladas, se resumen en la tabla 10. Tomando de nuevo como referencia la concentración de  $1 \mu\text{g/ml}$ , el grado de inhibición encontrado con las HBPM fue inferior al obtenido con los patrones internacionales de HNF y HBPM. Así,  $1 \mu\text{g}$  de FRX y CLX no produjeron ninguna inhibición del pico de trombina, y solo un 25% en el caso de FRG y LOG. Si se considera el área de la curva de trombina, se conseguía un 40% de inhibición con las dos primeras y un 60% con las segundas.

Estos datos se representaron en un sistema log-log, si se trataba del área bajo la curva (fig. 15) y en un sistema log dosis-respuesta cuando se trató de las concentraciones máximas de trombina (fig. 16), incluyendo también las rectas dosis-respuesta obtenidas para las preparaciones HNF(PI) y HBPM(PI). Como ocurrió para estos materiales, en el caso de las HBPM comerciales se encontró una buena linealidad y paralelismo, tanto para la relación dosis-respuesta calculada en función de la curva de trombina como para la calculada en base a los picos de trombina.

Los valores de CE50, obtenidos en base al área bajo la curva y a los valores de los picos de trombina, producidos en presencia de las distintas

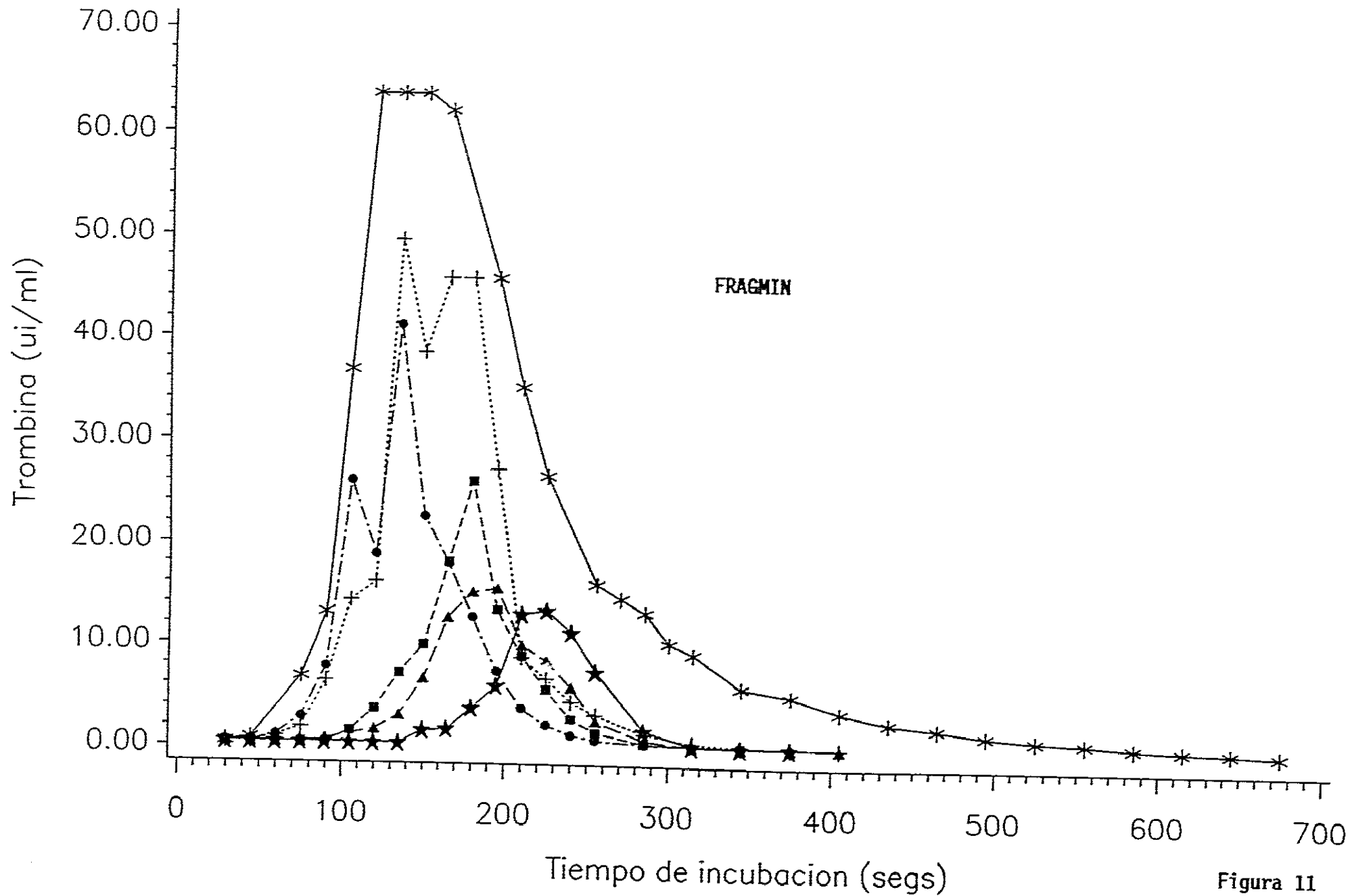
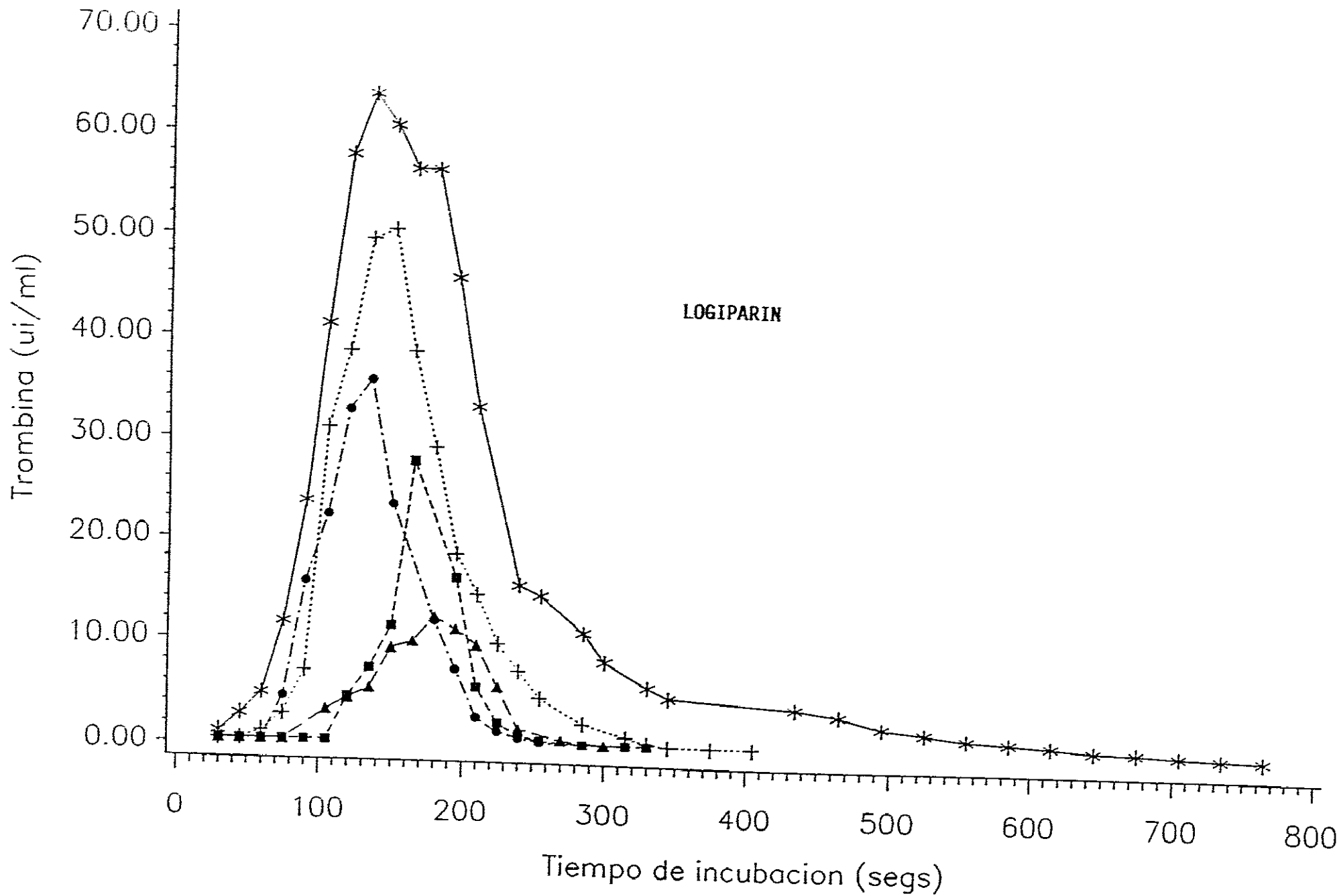
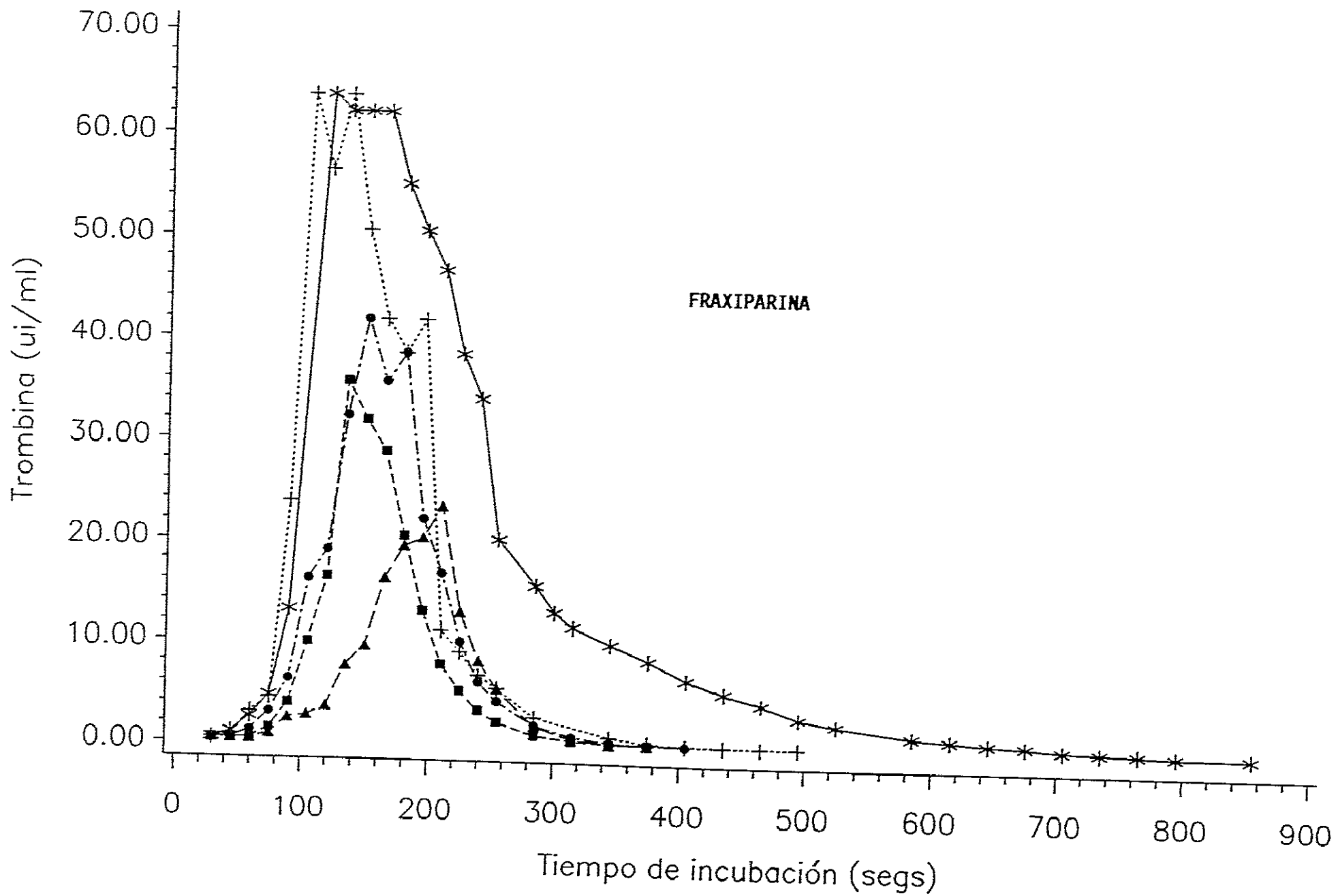


Figura 11



-\*- PPP - -+- PPP + LOG 1 ug -●- PPP + LOG 2 ug -■- PPP + LOG 3 ug -▲- PPP + LOG 4 ug

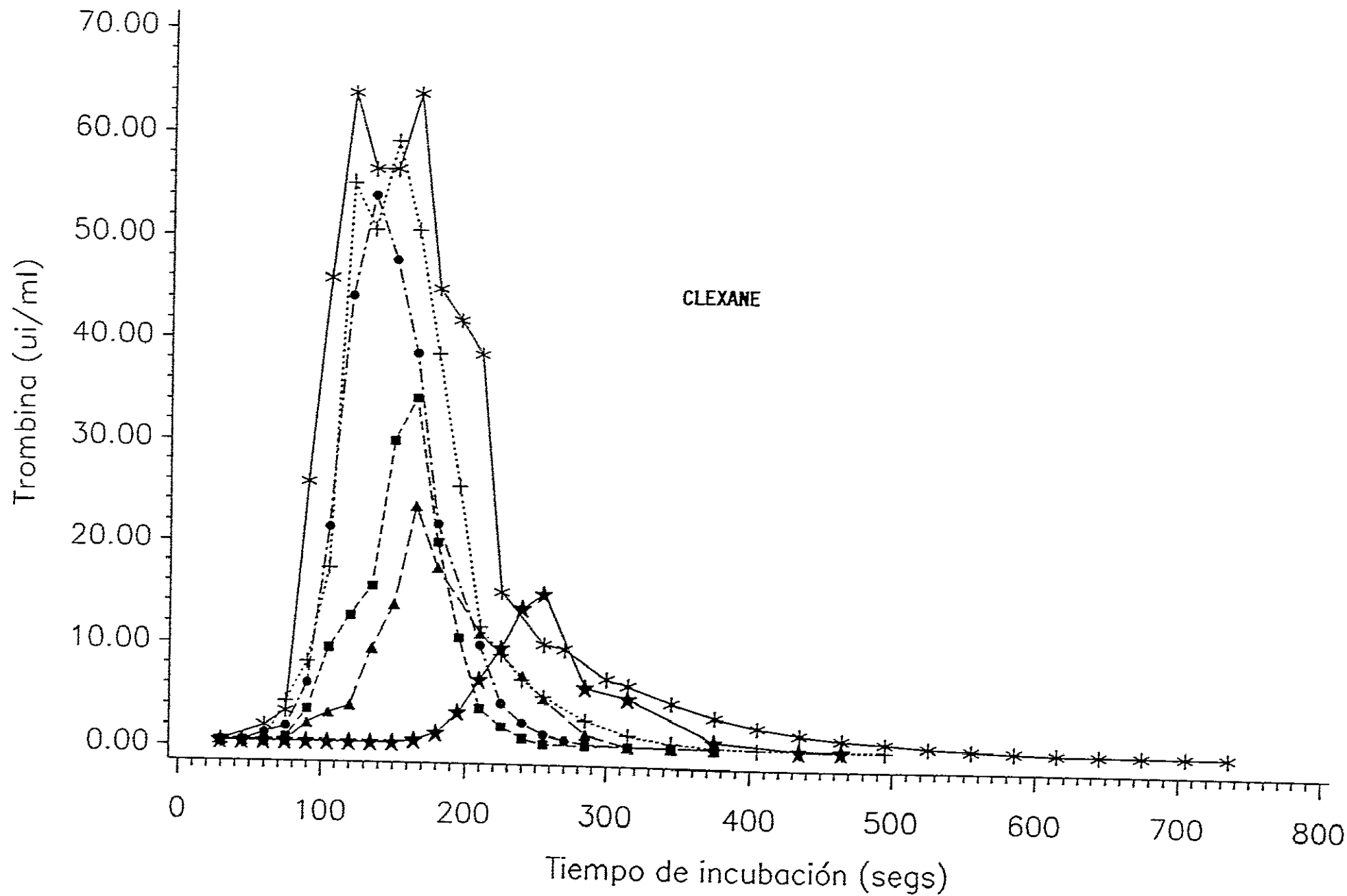
Figura 12



-\*- - PPP - -+-- - PPP + FRX 1 ug -●- PPP + FRX 2 ug -■- PPP + FRX 3 ug -▲- PPP + FRX 4 ug

Figura 13





-\*- - PPP -    -+- - PPP + CLX 1 ug    -●- PPP + CLX 2 ug    -■- PPP + CLX 3 ug    -▲- PPP + CLX 4 ug    -★- PPP + CLX 5 ug

**Figura 14**

**INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN PPP, POR HBPM COMERCIALES**

$\mu\text{g/ml}$	FRAGMIN		LOGIPARIN		FRAXIPARIN		CLEXANE	
	AbC %	Pico de trombina %	AbC %	Pico de trombina %	AbC %	Pico de trombina %	AbC %	Pico de trombina %
1	41.0±4.4	72.8±8.3	44.7±3.8	77.2±2.2	59.0±4.2	99.0±4.0	65.0±2.0	91.5±1.5
2	25.0±3.8	54.2±9.9	25.5±5.5	45.2±2.2	41.2±7.0	76.5±8.6	47.5±2.5	79.5±5.5
3	17.8±2.7	33.1±3.5	15.8±0.4	36.5±7.0	27.3±3.0	61.0±5.0	29.5±3.5	59.5±5.5
4	13.3±0.7	26.6±1.5	13.5±0.5	23.7±7.2	19.2±0.4	42.2±3.0	24.0±1.0	41.0±1.4
5	11.0±0.0	22.0±0.0	-	-	17.0±0.0	31.0±0.0	19.5±1.3	34.9±2.5

Tabla 10. Los datos representan la media de los resultados obtenidos para cada concentración de HBPM valorada. Las cifras incluídas a la derecha de los valores medios expresan el error estándar de la media.

GENERACIÓN DE TROMBINA EN PPP  
(Area Curva Trombina)

Trombina Generada (%)

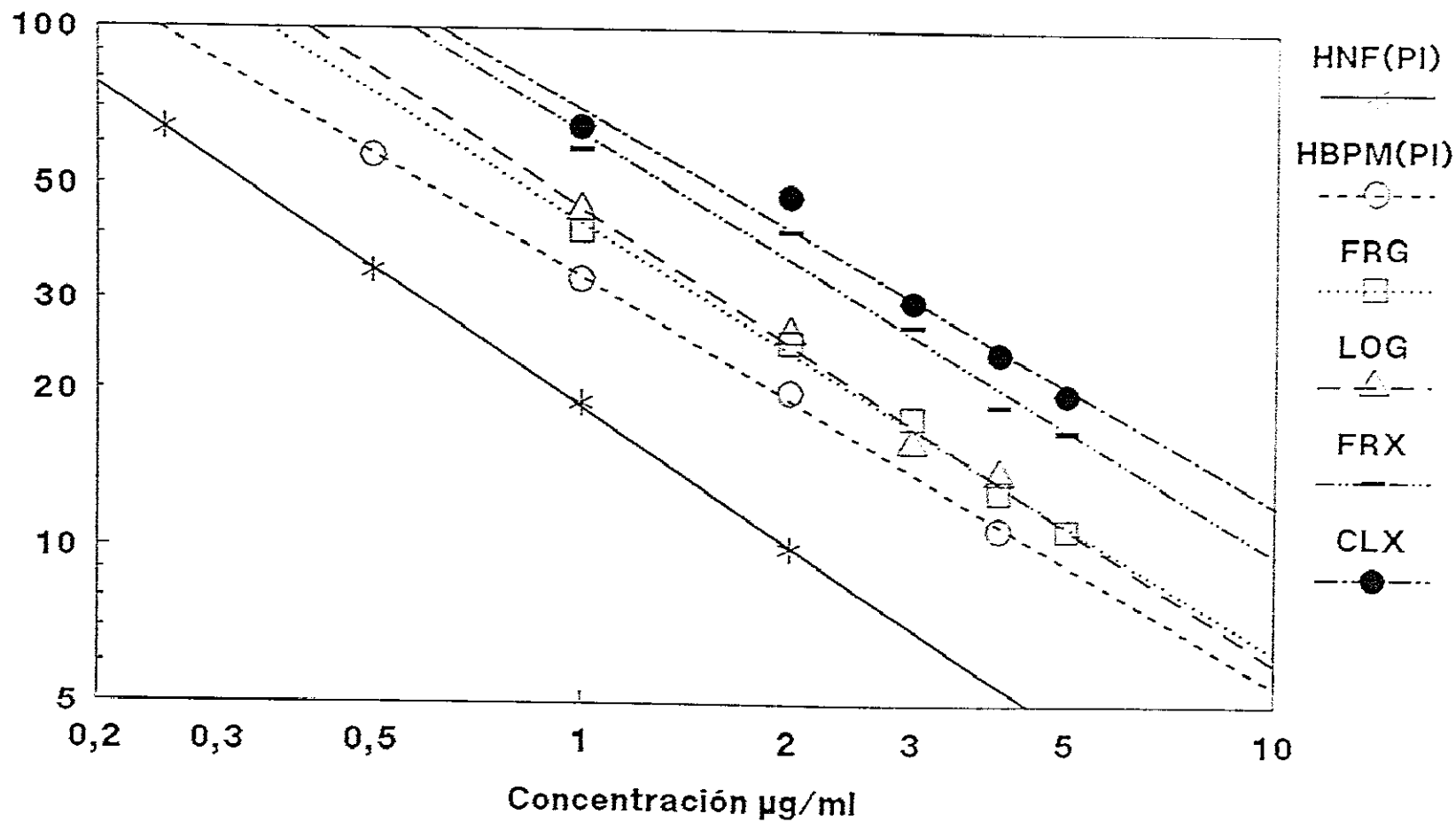


Figura 15

GENERACIÓN DE TROMBINA EN PPP  
(Concentración Pico de Trombina)

Trombina Generada (%)

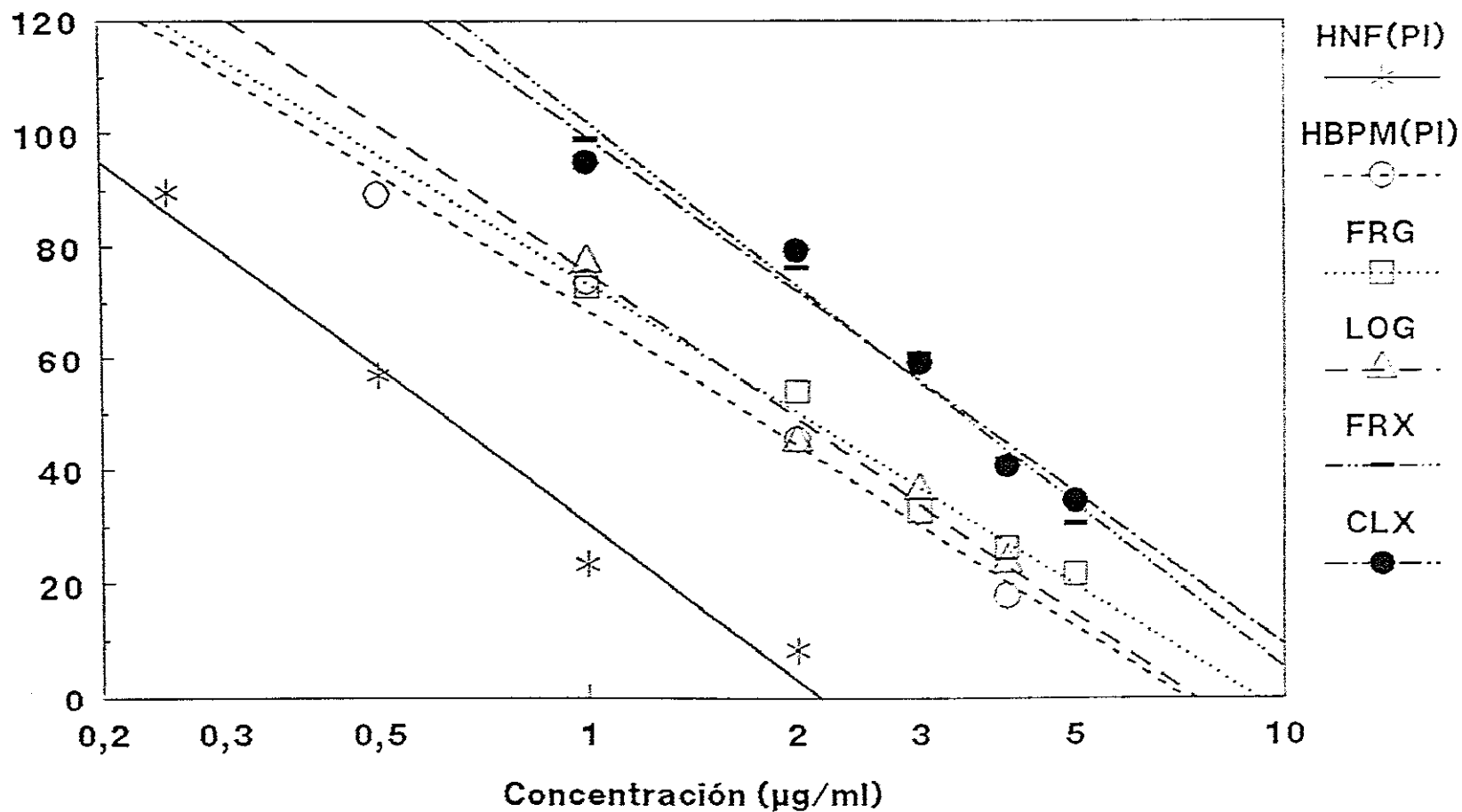


Figura 16

concentraciones de las HBPM (figs. 15 y 16), se recogen en la tabla 11 comparándolos con HNF(PI).

En una primera apreciación de estos resultados puede observarse que la concentración de cada HBPM comercial, que se necesita para alcanzar un grado similar de inhibición de generación de trombina, fue mucho más elevada que en el caso de HNF. Se encontraron además diferencias sustanciales, en términos de peso, entre las distintas HBPM investigadas: las cantidades requeridas para inhibir el 50% de la trombina generada por el control de plasma (en base al área bajo la curva) variaron desde aproximadamente dos veces (patrón de HBPM) a cinco veces (Clexane) la cantidad encontrada para HNF. Por otro lado, se necesitarían concentraciones más elevadas de los materiales referidos si los cálculos se realizaran a partir de la inhibición del pico o máxima concentración de trombina generada.

#### INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA: CE50

	Area Curva Trombina $\mu\text{g/ml}$	Pico de trombina $\mu\text{g/ml}$
HNF	0.33	0.34
HBPM	0.60	0.92
FRAGMIN	0.83	1.13
LOGIPARIN	0.92	1.11
FRAXIPARINA	1.37	2.26
CLEXANE	1.59	2.23

Tabla 11. Cantidad de cada heparina estudiada ( $\mu\text{g/ml}$  plasma), que sería necesaria para producir un 50% de inhibición de generación de trombina en PPP. Los datos se obtuvieron a partir de los gráficos de las figs. 15 y 16 respectivamente.

Es importante subrayar que aunque la HNF era marcadamente más potente que las HBPM valoradas, la condición de paralelismo entre las rectas dosis-respuesta sugiere un mecanismo de acción similar para ambos tipos de preparaciones. Esta condición de paralelismo se demostró en un análisis de varianza ( $p > 0.05$ ), calculándose la potencia de cada una de las HBPM comerciales frente a los dos patrones internacionales de HNF y de HBPM. La tabla 12 muestra los datos encontrados para cada preparación al multiplicar los valores de potencia, obtenidos en porcentaje en el análisis de líneas paralelas, por las actividades específicas conocidas para los patrones de HNF y HBPM.

#### POTENCIA DE LAS HBPM COMERCIALES FRENTE A HNF (PI) Y HBPM (PI)

	Area Curva Trombina		Pico de trombina	
	Frente a HNF(PI) ui/mg	Frente a HBPM (PI) ui/mg	Frente a HNF(PI) ui/mg	Frente a HBPM(PI) ui/mg
HBPM (PI)	93.1	-	68.6	-
FRAGMIN	70.6	51.4	54.8	53.3
LOGIPARIN	70.7	51.3	61.3	57.6
FRAXIPARINA	42.6	30.5	31.1	30.3
CLEXANE	36.3	25.8	33.8	33.0

Tabla 12. Actividades específicas de las HBPM comerciales en el ensayo de generación de trombina en PPP, comparadas con HNF(PI) y HBPM (PI).

Cuando el patrón internacional de HBPM se valoró frente al patrón internacional de HNF y se consideraron para los cálculos las concentraciones máximas de trombina, la actividad específica obtenida (68.6 ui/mg) fue la misma que la encontrada en el estudio de colaboración internacional

(Barrowcliffe et al., 1988) para este material, utilizando varios métodos. Cuando los cálculos se realizaron en base a los valores del área bajo la curva en las distintas concentraciones, la actividad específica de HBPM llegó a ser un 36% más elevada.

#### **IV.2.6 Correlación de las Potencias Inhibitorias de Generación de Trombina con las Actividades Específicas Anti-Xa y Anti-IIa**

Al comparar (tabla 13) las potencias inhibitorias de las HBPM, obtenidas en el ensayo de generación de trombina frente al patrón de HNF con sus actividades específicas medidas en ensayos amidolíticos anti-IIa, se observó que ambos tipos de actividades biológicas se correlacionaban perfectamente, ya fuera estimando los valores del área de la curva de trombina o las concentraciones máximas de trombina generada. Los coeficientes de correlación entre las dos medidas resultaron  $r=0.994$  ( $p<0.001$ ) si se estimaba el área bajo la curva, y  $r=0.998$  ( $p<0.001$ ) si se consideraban los valores de inhibición del pico de trombina. Sin embargo, la correlación entre la inhibición de generación de trombina y las actividades específicas anti-Xa mostradas en la misma tabla fue bastante inferior, con valores de  $r=0.843$  ( $p=0.035$ ) cuando se compararon los valores obtenidos en función del área de la curva de trombina, y  $r=0.787$  ( $p=0.063$ ) si se estimaban los valores del pico de trombina.

Una situación similar aparecía cuando se estimaron los valores CE50, en cuyo caso se encontró una relación inversa, de forma que las HBPM con los valores CE50 más elevados presentaban las actividades más bajas en el ensayo de generación de trombina y en ensayos anti-IIa. Esta relación no se encontró cuando los valores de CE50 obtenidos en los ensayos de generación de trombina se compararon con las actividades anti-Xa. Por ejemplo,

Fraxiparina y Clexane, a pesar de tener actividades anti-Xa más elevadas que Logiparin, fueron inhibidores de generación de trombina menos efectivos.

**POTENCIAS RELATIVAS DE LAS HBPM EN ENSAYOS DE GENERACIÓN DE TROMBINA, ANTI-Xa y ANTI-IIa**

	Inhibición de generación de trombina UI/mg		Anti-Xa UI/mg	Anti-IIa UI/mg
	Area Curva Trombina	Pico de Trombina		
HNF(PI)	193	193	193	193
HBPM(PI)	93.1	68.6	168	67
FRAGMIN	70.6	54.8	130	58
LOGIPARIN	70.7	61.3	79	53
FRAXIPARINA	42.6	31.1	95	27
CLEXANE	36.3	33.8	98	25

Tabla 13. Relación de los valores de actividad obtenidos frente a HNF(PI) en el ensayo de generación de trombina y en los ensayos amidolíticos anti-Xa y anti-IIa, que fueron objeto de comparación para calcular los coeficientes de correlación de ambos tipos de actividades.

**IV.2.7 Discusión**

Los resultados en esta sección presentan por primera vez datos comparativos de las HBPM como inhibidores de generación de trombina. Todas las preparaciones de HBPM fueron menos potentes que HNF aunque había también importantes diferencias entre las HBPM, variando los valores CE50 entre 0.60  $\mu\text{g/ml}$  para HBPM(PI) y 1.59  $\mu\text{g/ml}$  para CLX, ó entre 0.92 y 2.23  $\mu\text{g/ml}$  si se consideraban los valores de los picos de trombina. No obstante,



estas diferencias podían ser ampliamente explicadas por las diferencias entre sus actividades específicas anti-Xa y anti-IIa.

La capacidad de las HBPM para inhibir la generación de trombina se correlaciona mejor con sus actividades anti-IIa que con sus actividades anti-Xa. Estos resultados soportan la hipótesis de que la actividad anti-IIa es importante para la inhibición de generación de trombina *in vitro* por las HBPM. Sin embargo, cuando se considera la situación *in vivo*, deben tomarse en cuenta otros aspectos tales como la mejorada biodisponibilidad de las HBPM, en comparación a HNF, y su menor neutralización por F4P. Por ello, se efectuaron estudios de generación de trombina en presencia de F4P cuyos resultados se presentan a continuación.

### IV.3 NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD APTT DE HNF Y DE HBPM

El objetivo del estudio fue encontrar la cantidad de F4P necesaria para neutralizar el efecto de HNF y de las distintas HBPM en un sistema APTT, tomando como material de referencia 1  $\mu\text{g}$  del patrón internacional de HNF. Una vez conocida la cantidad de F4P que neutralizaba toda la actividad APTT de 1  $\mu\text{g}$  de HNF, se investigó si la misma cantidad neutralizaría actividades biológicas equivalentes del patrón internacional de HBPM y de las otras HBPM comerciales, en términos de actividad APTT.

#### IV.3.1 Patrón Internacional de HNF + Patrón Internacional de F4P

Inicialmente se utilizó el patrón internacional de F4P (83/505) a las concentraciones de 0.5 a 8 ng por ml de plasma (tabla 14 a,b), siguiendo el primer diseño indicado en la descripción del método APTT (ver pág. 56). Ninguna de estas concentraciones producía un efecto neutralizante sobre 1  $\mu\text{g}$  de HNF(PI). Todos los controles incluidos en el ensayo resultaron en los valores esperados para el lote de plasma utilizado (31/7). Los datos presentados corresponden a la media de dos estimaciones. Una muestra de la buena reproducibilidad del ensayo puede observarse en la tabla 14 a,b, en la que se han incluido los valores individuales de los tiempos de coagulación obtenidos para la concentración de 0.5 ng/ml de F4P y en ausencia de F4P.

La razón para ensayar tan bajas concentraciones de F4P fue la sospecha de que la preparación utilizada era más potente que los 382 ng declarados en la ampolla. El estudio de colaboración internacional, que se había realizado para calibrar la preparación referida y para comparar este material con otra preparación purificada, había mostrado amplias diferencias entre distintos laboratorios, en cuanto a su actividad biológica (datos no publicados).

### ENSAYOS APTT: PATRÓN INTERNACIONAL DE F4P

(a)			(b)		
F4P (ng/ml)	Tampón TTS	HNF 1µg/ml	F4P (ng/ml)	Tampón TTS	HNF 1µg/ml
0.5	40.0	90.7	-	41.8	91.4
2	40.1	93.7	1	41.6	95.3
8	40.0	88.6	4	41.0	91.2
0.5	40.1	88.6	-	40.5	93.0
(c)			(d)		
F4P (ng/ml)	Tampón TTS	HNF 1µg/ml	F4P (ng/ml)	Tampón TTS	HNF 1µg/ml
-	45.7	101	-	45.4	105
382	51.30	53.25	764	153.5	163

Tabla 14 a), b), c), d). Tiempos de coagulación (seg) del plasma control (tampón) y plasma heparinizado (HNF 1 µg/ml) en presencia de distintas concentraciones de F4P (83/505) y en ausencia de esta preparación.

En los siguientes ensayos, se estimó que la concentración máxima que podía conseguirse al reconstituir la ampolla de esta preparación en 1 ml de agua destilada era de 382 ng de F4P por ml de plasma. En los ensayos se utilizaron 100 µl de esta solución, siguiendo el diseño alternativo (Diseño 2) ya descrito en el método de referencia (APTT, pág. 56). Los tiempos de coagulación del plasma control fueron algo más largos que los obtenidos en los ensayos anteriores, en ausencia y en presencia de heparina, debido a la mayor dilución del plasma en este diseño. Los resultados mostraron (tabla 14c) que esta cantidad de F4P era aún insuficiente para neutralizar 1 µg de HNF. A la vez pudo observarse una prolongación del tiempo de coagulación en el control de F4P que significaba alguna interferencia de la preparación sobre el ensayo de APTT.

Al reconstituir la ampolla de F4P con 500 µl de agua destilada y tomar

igualmente 100  $\mu$ l para conseguir una concentración de 764 ng por ml de plasma, el tiempo de coagulación para el control de F4P se incrementó de forma anormal en relación al del plasma control (tabla 14d). La explicación de este efecto, que no había sido tan evidente en el ensayo previo, podría ser una elevada concentración de sales en la preparación, que resultaba alrededor de 1.2 M NaCl en la mezcla final del ensayo. También en este caso se observaron valores ligeramente superiores del plasma control respecto a los ensayos donde el plasma estaba menos diluido (Diseño 1).

Una curva dosis-respuesta se diseñó por último, con la preparación reconstituida en 1 ml de agua destilada, realizando las diluciones en TTS. Una muestra de 100  $\mu$ l se tomó también en este caso (Diseño 2). Como puede observarse en la tabla 15, se confirmaron los resultados que se habían obtenido previamente, mostrando que la preparación de F4P 83/505 era inadecuada para su uso en ensayos de APTT.

#### F4P (PI): CURVA DOSIS-RESPUESTA

F4P Dilución	Tampón TTS	HNF 1 $\mu$ g/ml
-	45.0	95.0
1/2	49.5	82.1
1/3	47.5	84.0
1/4	46.5	75.0
1/5	57.5	96.0
1/6	45.0	82.5
382 ng/ml	63.5	82.5

Tabla 15. Tiempos de coagulación obtenidos para el control de plasma y plasma heparinizado cuando se adicionaron distintas cantidades de F4P(PI). Las concentraciones más elevadas de F4P prolongan los tiempos de coagulación del tampón.

Los datos indican que la preparación no era idónea para estudios de neutralización por dos razones: no existía suficiente material en las ampollas para neutralizar 1  $\mu\text{g/ml}$  de HNF(PI) y la preparación influía en los ensayos de APTT, prolongando los tiempos de coagulación. La variabilidad en los resultados podía deberse al efecto de la concentración de sales o a diferencias de solubilidad al haber reconstituido la ampolla en agua destilada y obtener las diluciones de trabajo en TTS.

#### IV.3.2 Patrón Internacional de HNF + Preparación de F4P 82/648

Se analizó una segunda preparación de F4P purificado, NIBSC 82/648 (tabla 16). La actividad biológica de esta preparación se estimó en 500 ng por ampolla, cifra obtenida del protocolo utilizado en el estudio de colaboración internacional para establecer el patrón de F4P purificado humano (datos no publicados).

#### ENSAYOS APTT: F4P 82/648

F4P ng/ml	TTS	HNF 1 $\mu\text{g/ml}$
-	46.4	95.0
500	125.3	138.3
1000	241.4	455.4

Tabla 16. Incremento de los tiempos de coagulación (seg) del control de F4P (500 ng y 1000 ng) así como en presencia de heparina, en comparación con los del plasma control (TTS).

Se reconstituyeron dos ampollas con 0.5 y 1 ml de agua destilada respectivamente, tomando 100  $\mu\text{l}$  directamente de esta solución para los ensayos, a fin de obtener concentraciones finales de 500 y 1000 ng de F4P por ml de plasma. La preparación 82/648 mostraba de nuevo una prolongación

de los tiempos de coagulación del plasma control. En consecuencia era también inadecuada para ensayos de APTT.

Aunque no se pudieron encontrar detalles de la composición de este material, la razón de esta alteración en los tiempos de coagulación era muy probablemente debida a una alta concentración de sales. Todos los datos representan la media de al menos dos determinaciones.

#### **IV.3.3 Patrón Internacional de HNF + Preparación de F4P (R)**

Por indicación del Dr. Duncan Pepper (comunicación personal) se conocía que la preparación F4P (R) no sería soluble en solución salina, en una concentración superior a 25  $\mu\text{g/ml}$ . Para superar esta dificultad técnica se decidió utilizar diluyentes de alta concentración salina y bajo pH.

El diluyente de NaCl 2M Tris 50 mM, pH 7.4 se consideró adecuado para los ensayos de APTT, comprobándose que este diluyente no interferiría en los tiempos de coagulación del plasma al utilizar volúmenes de 5 y 10  $\mu\text{l}$  de muestra, en la mezcla de reacción final (tabla 17), con 90 y 80  $\mu\text{l}$  de plasma respectivamente. Se comprobó asimismo que no sería posible utilizar volúmenes de 100  $\mu\text{l}$  de este material. Un diluyente alternativo de F4P, ácido acético al 10 % (v/v) en agua, se rechazó también por su interferencia en los ensayos, al no permitir la coagulación del plasma. Otras alternativas para disolver F4P, como calentamiento a 37°C o ultrasonicación no se utilizaron para evitar problemas de estabilidad.

Los tiempos de coagulación del plasma control indicados en la tabla son la media de todas las estimaciones obtenidas en estos experimentos, que fueron un total de 10 en los distintos diseños analizados. No obstante estos

valores variaron dependiendo del diseño escogido, siendo  $41.6 \pm 0.6$  seg la media obtenida para el control de plasma ( $90 \mu\text{l}$ ) en presencia de  $10 \mu\text{l}$  TTS.

#### DILUYENTES DE F4P EN ENSAYOS APTT

NaCl2M ( $\mu\text{l}$ )	T° de Coagulación (seg)	A. Acético 10% ( $\mu\text{l}$ )	T° de Coagulación (seg)
0	$42.3 \pm 1.2$	0	$42.3 \pm 1.2$
5	$41.7 \pm 0.2$	5	> 500
10	$42.7 \pm 0.2$	10	> 800
100	> 800		

Tabla 17. Incremento del tiempo de coagulación del plasma control en presencia de  $100 \mu\text{l}$  de NaCl 2M y en presencia de ácido acético 10%. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar para cada medida.

Con la preparación de F4P (R) disuelta en NaCl 2M Tris 50 mM pH 7.4, se ensayó un rango de concentraciones de 0.4 a  $10 \mu\text{g}$  por ml de plasma en presencia de  $1 \mu\text{g}$  de HNF (tabla 18), realizándose cuatro ensayos: el primero con 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 y  $5 \mu\text{g}$  de F4P; los tres restantes con 5, 7 y  $10 \mu\text{g}$ .

#### ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN: F4P (R) + $1 \mu\text{g}$ de HNF

F4P $\mu\text{g/ml}$	NEUTRALIZACIÓN %
0.4 a 2.0	0
5.0	$46.8 \pm 2.7$ (n=4)
7.0	$70.0 \pm 3.0$ (n=3)
10.0	$95.1 \pm 2.5$ (n=3)

Tabla 18. Valores medios de los porcentajes de neutralización ( $\pm$  error estándar) de  $1 \mu\text{g}$  de HNF por 5, 7 y  $10 \mu\text{g}$  de F4P(R) por ml de plasma. El valor de n corresponde al número de estimaciones.

Ninguna neutralización se observó con  $0.4 \mu\text{g}$  a  $2 \mu\text{g}$ . Resultados

reproducibles del porcentaje de neutralización se obtuvieron en el rango de 5 a 10  $\mu\text{g}$  de F4P(R). El porcentaje de neutralización se calculó de acuerdo a la fórmula expresada previamente en la sección de métodos (pág. 77). Los resultados obtenidos en estos experimentos (tabla 18), mostraron que 10  $\mu\text{g}$  de F4P por ml de plasma serían necesarios para neutralizar al menos 95% de la actividad APTT de 1  $\mu\text{g}$  de HNF.

A modo de comprobación se analizaron concentraciones de 5, 7, 10 y 20  $\mu\text{g}$  de F4P(R) en presencia de 2  $\mu\text{g}$  de HNF. La tabla 19 muestra los valores de neutralización encontrados en estas condiciones de ensayo. Podía concluirse que 20  $\mu\text{g}$  de F4P serían necesarios para neutralizar al menos 96% de la actividad APTT de 2  $\mu\text{g}$  de HNF en las condiciones de ensayo.

En el curso de estos ensayos se cambió el lote de plasma, del 31/7 al 13/11. El tiempo de coagulación del plasma control varió para los dos lotes de plasma empleados, obteniéndose una media de  $43.2 \pm 0.6$  seg para el lote 31/7 y una media de  $39.3 \pm 0.7$  seg para el lote 13/11. Un mínimo de cuatro estimaciones del plasma control se incluyó en todos los ensayos.

#### ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN: F4P (R) + 2 $\mu\text{g}$ de HNF

F4P $\mu\text{g/ml}$	Neutralización %
5	$21.8 \pm 3.2$
7	$48.9 \pm 2.0$
10	$70.0 \pm 5.0$
20	$96.3 \pm 3.7$

Tabla 19. Porcentaje de neutralización de 2  $\mu\text{g}$  de HNF por 5, 7, 10 y 20  $\mu\text{g}$  de F4P(R) por ml de plasma. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de dos ensayos independientes.



#### IV.3.4 Patrón Internacional de HBPM + Preparación de F4P (R)

Los ensayos siguientes se diseñaron para determinar la cantidad de HBPM(PI) que mostraría una actividad equivalente a 1  $\mu\text{g}$  de HNF en el sistema APTT, y que podría asimismo ser neutralizada por 10  $\mu\text{g}$  de F4P(R). El tiempo de coagulación para el control de plasma en estos ensayos fue de  $40.3 \pm 0.32$ .

Como se observa en la tabla 20, la equivalencia en términos de prolongación del tiempo de coagulación del control de plasma, entre los patrones internacionales de HNF y de HBPM, fue de 1  $\mu\text{g}$  y 4  $\mu\text{g}$  respectivamente. Es decir, 4  $\mu\text{g}$  de HBPM (PI) eran necesarios para producir un efecto similar a 1  $\mu\text{g}$  de HNF en el sistema APTT.

#### CURVA DOSIS-RESPUESTA DE HBPM(PI)

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Actividad anti-IIa (UI/ml)	T° de coagulación (seg)
HBPM		
2	0.13	$58.1 \pm 1.2$
4	0.26	$75.0 \pm 4.3$
6	0.40	$87.6 \pm 3.3$
8	0.53	$104.0 \pm 2.3$
HNF		
1	0.19	$77.7 \pm 3.3$
2	0.39	$113.0 \pm 2.3$

Tabla 20. Curva dosis-respuesta obtenida para el HBPM(PI), entre 2 y 8  $\mu\text{g}$  de esta preparación. La prolongación del tiempo de coagulación del plasma se muestra en comparación con el efecto de 1 y 2  $\mu\text{g}$  de HNF/ml de plasma, en el mismo sistema de ensayo. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de tres ensayos.

En la tabla se han incluido también los valores correspondientes a la actividad anti-Ila, calculados a partir de la actividad específica de HBPM (PI) y de HNF (PI). Según estos valores, la actividad anti-Ila de 1 y 2  $\mu\text{g}$  de HNF, equivaldría aproximadamente a 3 y 6  $\mu\text{g}$  de HBPM.

Los experimentos con 4  $\mu\text{g}$  de HBPM(PI) y distintas concentraciones de F4P(R) de 25, 30, 35 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma, mostraron que concentraciones tan elevadas como 35  $\mu\text{g}$  de F4P(R)/ml de plasma neutralizaban solamente el 75% de la actividad de HBPM(PI) en el sistema APTT (tabla 21). Con la misma concentración de F4P(R) podía obtenerse al menos un 90% de neutralización de la actividad APTT de 2  $\mu\text{g}$  del patrón de HBPM.

#### ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN: F4P(R) + HBPM(PI)

4 $\mu\text{g}$ de HBPM		
F4P $\mu\text{g}/\text{ml}$	Neutralización %	
25	61.9 $\pm$ 6.0	n = 2
30	66.0 $\pm$ 0.3	n = 2
35	75.7 $\pm$ 0.1	n = 2
40	77.6 $\pm$ 3.5	n = 3
2 $\mu\text{g}$ de HBPM		
35	90.5 $\pm$ 6.0	n = 3

Tabla 21. Porcentajes de neutralización de 2 y 4  $\mu\text{g}$  de HBPM(PI) por varias concentraciones de F4P(R). Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar del número de experimentos (n) que se indican.

#### IV.3.5 HBPM Comerciales + Preparación de F4P (R)

Con respecto al comportamiento de las HBPM comerciales en el sistema APTT, se valoraron distintas concentraciones de CLX. La curva dosis-

respuesta obtenida (tabla 22) fue mucho más plana que la encontrada para HNF: aún 5  $\mu\text{g}$  de Clexane producían una prolongación del tiempo de coagulación inferior a 1  $\mu\text{g}$  de HNF. Es decir el efecto de 5  $\mu\text{g}$  de CLX en un sistema APTT es muy inferior al producido por 1  $\mu\text{g}$  de HNF en el mismo sistema. La actividad anti-IIa correspondiente a la concentración de 5  $\mu\text{g}$ , calculada como en el caso anterior a partir de la actividad específica obtenida para CLX (ver sec. IV.1, pág. 92), resultaba asimismo inferior a la exhibida por 1  $\mu\text{g}$  de HNF, que equivalía aproximadamente a 8  $\mu\text{g}$  de la preparación.

#### CURVA DOSIS-RESPUESTA DE CLEXANE

CLX ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Actividad anti-IIa (U/ml)	T° de coagulación (seg)
0	-	41.9 $\pm$ 0.5
1	0.025	45.2 $\pm$ 0.1
2	0.050	50.0 $\pm$ 0.5
3	0.075	52.2 $\pm$ 0.7
4	0.10	54.4 $\pm$ 0.4
5	0.12	56.5 $\pm$ 0.5
HNF (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0.19	76.1 $\pm$ 2.7

Tabla 22. Tiempos de coagulación obtenidos a distintas concentraciones de CLX por ml de plasma, en el sistema de ensayo APTT, mostrados en comparación con 1  $\mu\text{g}$  de HNF. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de dos ensayos independientes.

A modo de ensayos tentativos, se escogieron 5  $\mu\text{g}$  de CLX para estudiar el efecto neutralizante de distintas concentraciones de F4P(R): 14, 25, 40 y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma. Cuando se ensayaron concentraciones de F4P(R) tan elevadas como 40  $\mu\text{g}$ , 20 % de la actividad de 5  $\mu\text{g}$  de CLX en el sistema APTT quedaba todavía sin neutralizar (tabla 23). Concentraciones mayores de F4P(R) de hasta 100  $\mu\text{g}$  no lograron una neutralización superior.

**ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN: F4P(R) + 5  $\mu$ g de CLX**

F4P $\mu$ g/ml	% Neutralización	
	CLX 5 $\mu$ g	HNF 1 $\mu$ g
14	54.6 $\pm$ 0.9	96.0 $\pm$ 0.7
25	67.9 $\pm$ 0.5	-
40	75.6 $\pm$ 1.0	-

Tabla 23. Porcentaje de neutralización de CLX 5  $\mu$ g por varias concentraciones de F4P, en comparación con 1  $\mu$ g de HNF. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de dos o más ensayos independientes.

#### IV.3.6 Discusión

Los resultados indicados muestran que el método APTT inicialmente escogido para los estudios de neutralización de heparina por F4P no era el sistema adecuado, debido a la influencia de las preparaciones de F4P sobre los tiempos de coagulación del plasma y además a la menor sensibilidad de este sistema de ensayo para las HBPM que para HNF.

Como se ha indicado ya, 4  $\mu$ g de HBPM (PI) mostraban la misma actividad APTT que 1  $\mu$ g de HNF y en el caso de CLX, una alta concentración de esta preparación (5  $\mu$ g) parecía alcanzar un efecto meseta sobre el tiempo de coagulación del plasma (57 seg), siendo todavía muy inferior al efecto causado en el mismo sistema por 1  $\mu$ g de HNF (76 seg). Sin embargo, si consideramos los valores de actividad específica de HBPM y CLX obtenidos en un sistema de actividad anti-IIa, apenas 3  $\mu$ g de HBPM (PI) debían producir ya la misma actividad que 1  $\mu$ g de HNF; presentando CLX una actividad específica anti-IIa aproximadamente ocho veces inferior a HNF.

Los ensayos de neutralización realizados en esta sección han indicado

que 10  $\mu\text{g}$  de F4P(R) neutralizarían al menos 95% de la actividad APTT de 1  $\mu\text{g}$  de HNF, pero 40  $\mu\text{g}$  solo lograron neutralizar el 75% de la actividad de 4  $\mu\text{g}$  de HBPM y la misma proporción de la actividad mostrada por 5  $\mu\text{g}$  de CLX. Únicamente la preparación de F4P(R) se utilizó en los restantes estudios de neutralización que se describen seguidamente en la presente memoria.

Como alternativa al método de APTT, la investigación sobre estudios de neutralización de heparinas por F4P realizada posteriormente, se llevó a cabo midiendo la actividad anti-IIa en ensayos de sustratos cromogénicos por ser un sistema de ensayo más sensible y definido, en particular si se trataba de comparar los resultados posteriormente con el comportamiento de los mismos materiales en la inactivación de la actividad anti-Xa. La investigación realizada sobre estudios de neutralización de heparinas por F4P con la metodología indicada, además de en un sistema de generación de trombina, se recoge en la siguiente sección.

#### **IV.4 NEUTRALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES INHIBITORIAS DE GENERACIÓN DE TROMBINA, ANTI-Xa Y ANTI-IIa DE HNF Y DE HBPM**

En secciones anteriores se ha estudiado la eficacia de HNF(PI) y de varias preparaciones de HBPM como inhibidores de generación de trombina, sus potencias en ensayos convencionales anti-Xa y anti-IIa por sustratos cromogénicos y cómo estas actividades podrían estar relacionadas. Se ha demostrado asimismo que el método APTT no podía ser el método de elección para estudios de neutralización de heparinas por F4P, a la vez que se han evaluado distintos concentrados de F4P.

Como continuación de estas observaciones, esta sección describirá los experimentos llevados a cabo para establecer la proporción en la que las heparinas objeto de estudio, HNF(PI) y cinco HBPM, pueden ser neutralizadas por una determinada preparación de F4P, F4P(R), en los ensayos de generación de trombina y ensayos amidolíticos anti-IIa y anti-Xa.

##### **IV.4.1 Efecto de F4P sobre las Actividades Biológicas de Generación de Trombina, anti-Xa y anti-IIa**

El objetivo del estudio de neutralización con el F4P purificado, F4P(R), fue investigar si el patrón internacional de HBPM y cuatro HBPM comerciales, mostraban una resistencia incrementada a la neutralización por F4P, en comparación con HNF.

En experimentos previos se había determinado que la concentración de las HBPM, que producía una inhibición equivalente a 1  $\mu\text{g}$  de HNF en un sistema de generación de trombina en PPP (80% de inhibición), correspondía a 2  $\mu\text{g}$  para HBPM, 3  $\mu\text{g}$  para FRG y LOG, 4  $\mu\text{g}$  para FRX y 5  $\mu\text{g}$  para CLX.

En otras palabras 2, 3, 4 ó 5 veces de los materiales referidos se necesitaron, en términos de peso, para conseguir la misma actividad anticoagulante que 1  $\mu\text{g}$  de HNF. Las mismas concentraciones de HNF y de las HBPM se utilizaron para comparar los efectos neutralizantes de F4P en los ensayos de generación de trombina y amidolíticos anti-IIa y anti-Xa. La tabla 24 muestra las actividades biológicas anti-Xa y anti-IIa, equivalentes en estos sistemas de ensayo, expresadas en unidades internacionales.

#### ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE HNF Y DE HBPM UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN POR F4P

	Anti-IIa (UI)	Anti-Xa (UI)
HNF(PI) 1 $\mu\text{g}$	0.19	0.19
HBPM(PI) 2 $\mu\text{g}$	0.13	0.34
FRAGMIN 3 $\mu\text{g}$	0.17	0.39
LOGIPARIN 3 $\mu\text{g}$	0.16	0.24
FRAXIPARINA 4 $\mu\text{g}$	0.13	0.47
CLEXANE 5 $\mu\text{g}$	0.12	0.49

Tabla 24. Concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma) de HNF y HBPM, expresadas en unidades internacionales, de acuerdo a sus actividades específicas.

El paso siguiente era analizar si la misma actividad biológica podía ser neutralizada por la misma cantidad de F4P. Cantidades crecientes de F4P(R) de 6, 8, 10, 12 y 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en la mezcla de reacción final, se utilizaron primero en ensayos anti-IIa, con una concentración fija de HNF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a fin de establecer la concentración mínima de F4P necesaria para neutralizar toda la actividad anti-IIa de esa concentración de HNF. Concentraciones más elevadas de F4P(R), de 14  $\mu\text{g}$  a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se utilizaron después en ensayos anti-Xa, anti-IIa y de generación de trombina, para estudiar la capacidad de neutralización por F4P de las distintas HBPM en comparación con HNF.

La cantidad de F4P obtenida en los ensayos de APTT como la mínima necesaria para neutralizar 1  $\mu\text{g}$  de HNF, fue 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma (sec. IV.3, pág. 126). Al introducir los ensayos de actividad anti-IIa, se confirmó con mayor precisión que la concentración mínima de F4P(R), que neutralizaría toda la actividad anti-IIa de 1  $\mu\text{g}$  de HNF, era 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (fig. 17). Esta concentración de F4P se utilizó posteriormente en estudios comparativos de HNF y de las diversas HBPM, en ensayos anti-Xa y de generación de trombina.

Dos lotes diferentes de F4P(R) se incluyeron en estos experimentos. Para determinar si su capacidad de neutralización sería equivalente, tres concentraciones de ambos lotes 6,8 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se valoraron frente a 1  $\mu\text{g}$  de HNF en ensayos anti-IIa. Un análisis de varianza de los resultados obtenidos rindió líneas paralelas, informando un comportamiento similar de ambos lotes. Cuando el primer lote utilizado se consideró como patrón, los valores del segundo lote fueron los siguientes:

<u>Método amidolítico</u>	<u>Representación Gráfica</u>	<u>Resultados (%)</u>
alla (ATIII)	Log dosis-respuesta	108 (105-111)

La fig. 18 muestra el gráfico correspondiente a estos ensayos. Sobre la base de estos datos, ambos lotes de F4P se estimaron equivalentes en el curso de este estudio.

Los efectos de 14  $\mu\text{g}$  de F4P(R) sobre las distintas heparinas se investigaron en los tres sistemas de ensayo referidos. Un resumen de los datos observados se muestra en la fig. 19. A esta concentración de F4P se neutralizaron más del 90% de las actividades anti-Xa y anti-IIa de HNF mientras que la neutralización en el sistema de generación de trombina fue del orden de 80%. Para las HBPM, sin embargo, existían marcadas diferencias en



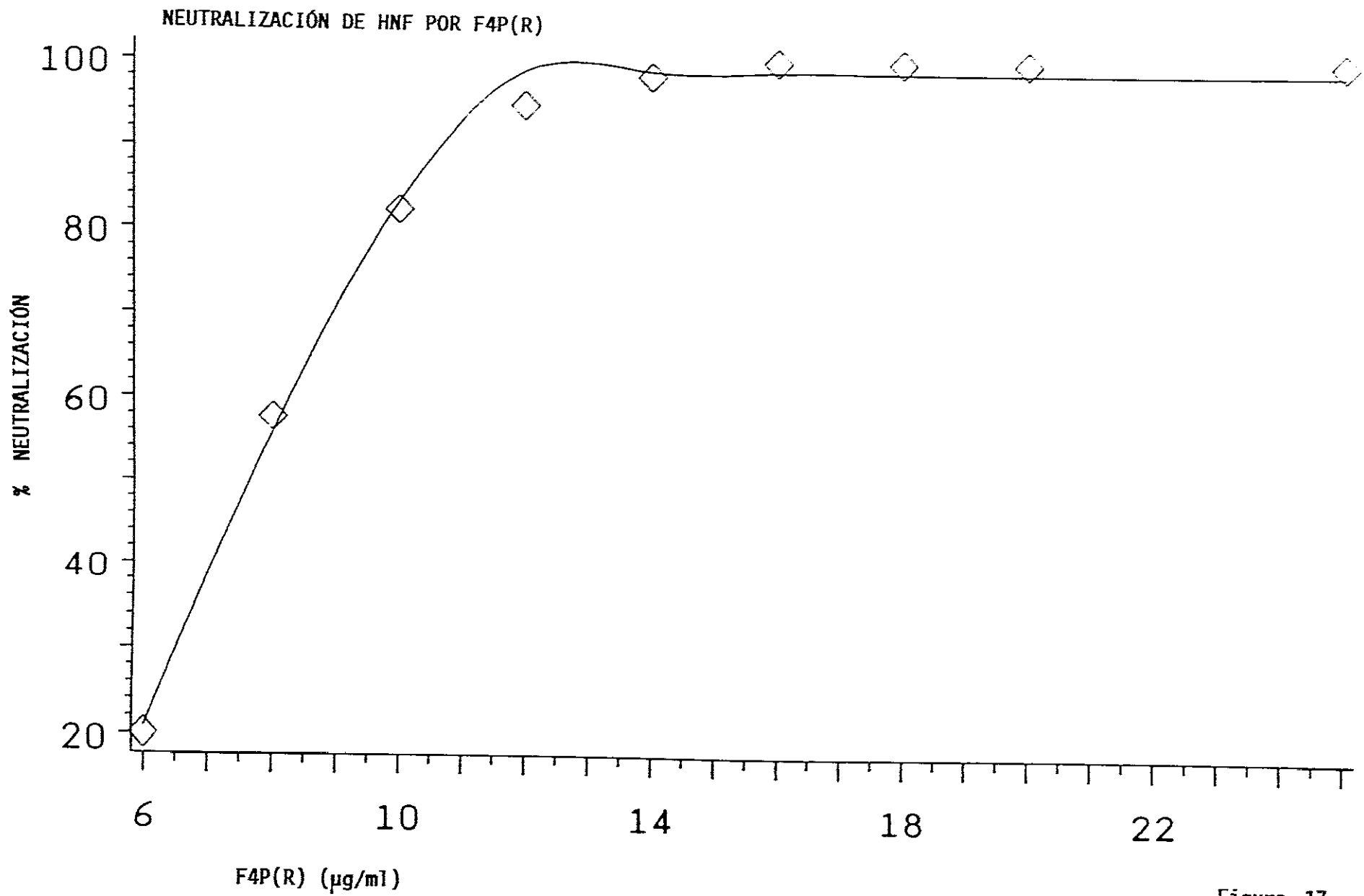


Figura 17

# VALORACIÓN DE F4P(R) FRENTE A HNF (1µg/ml)

Actividad Anti-Ila

ABSORBANCIA (D0)

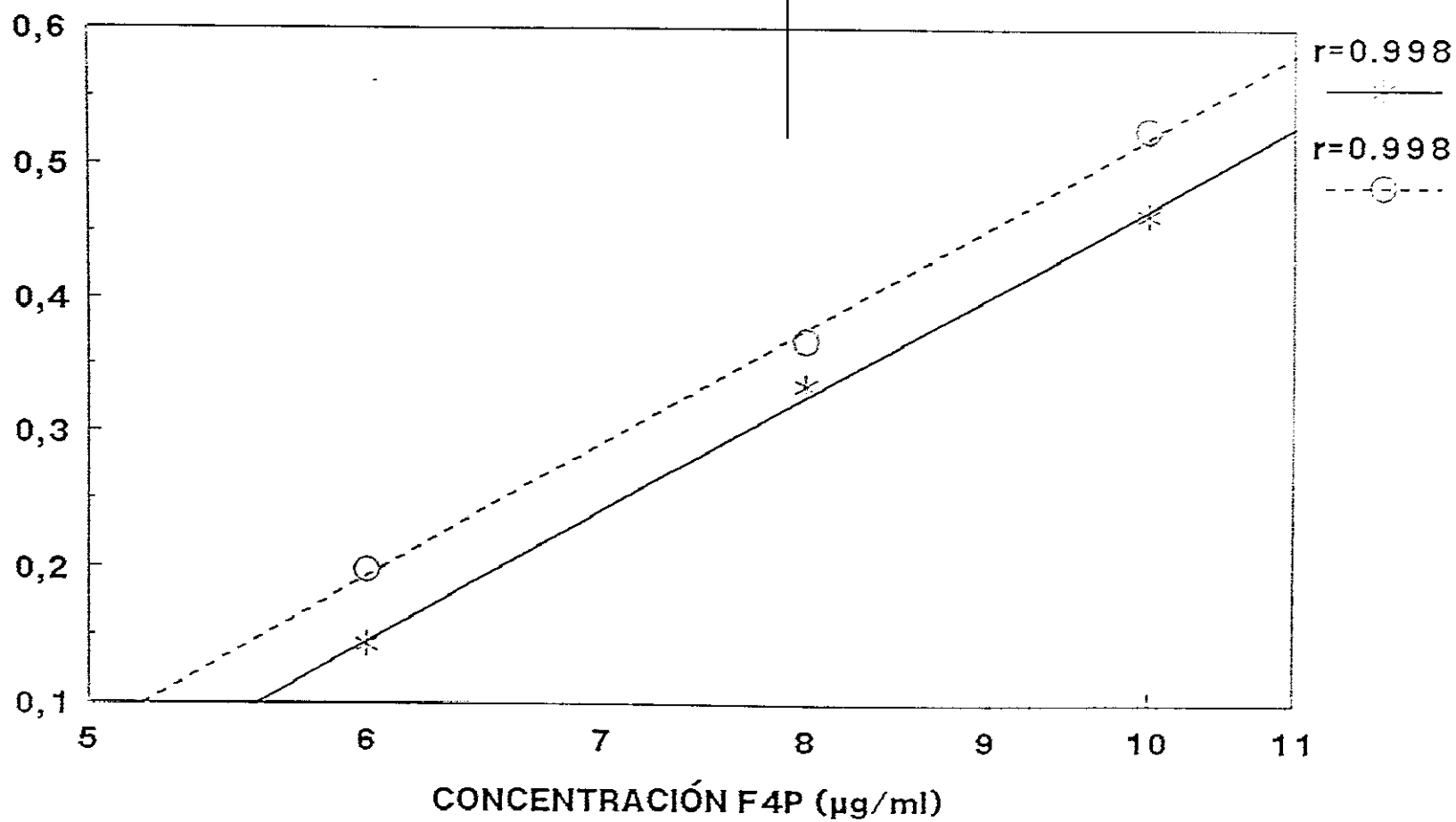
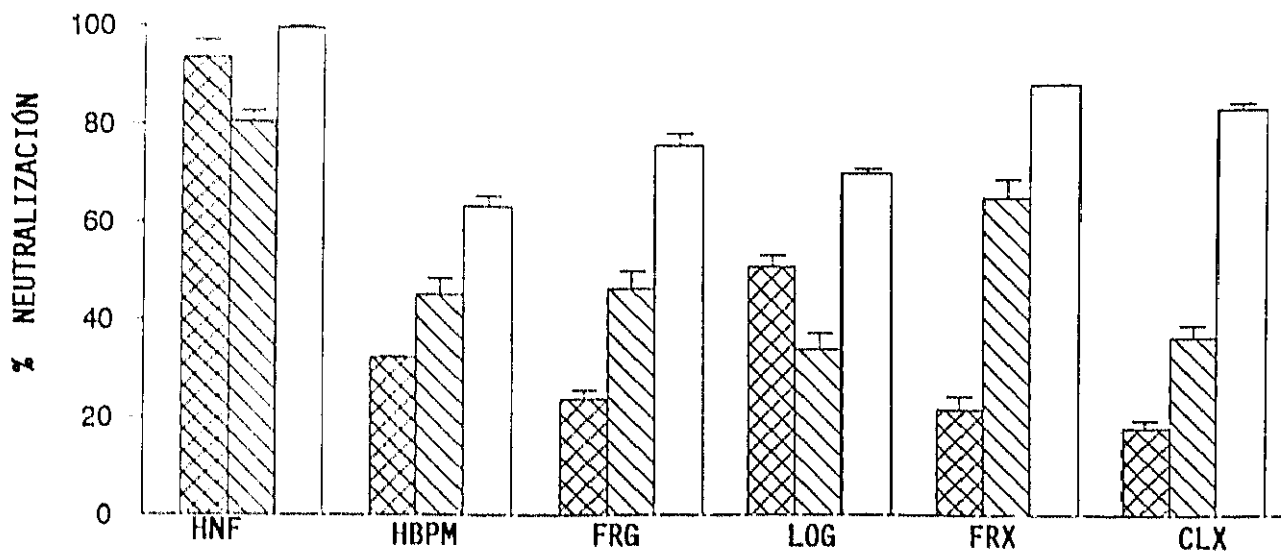
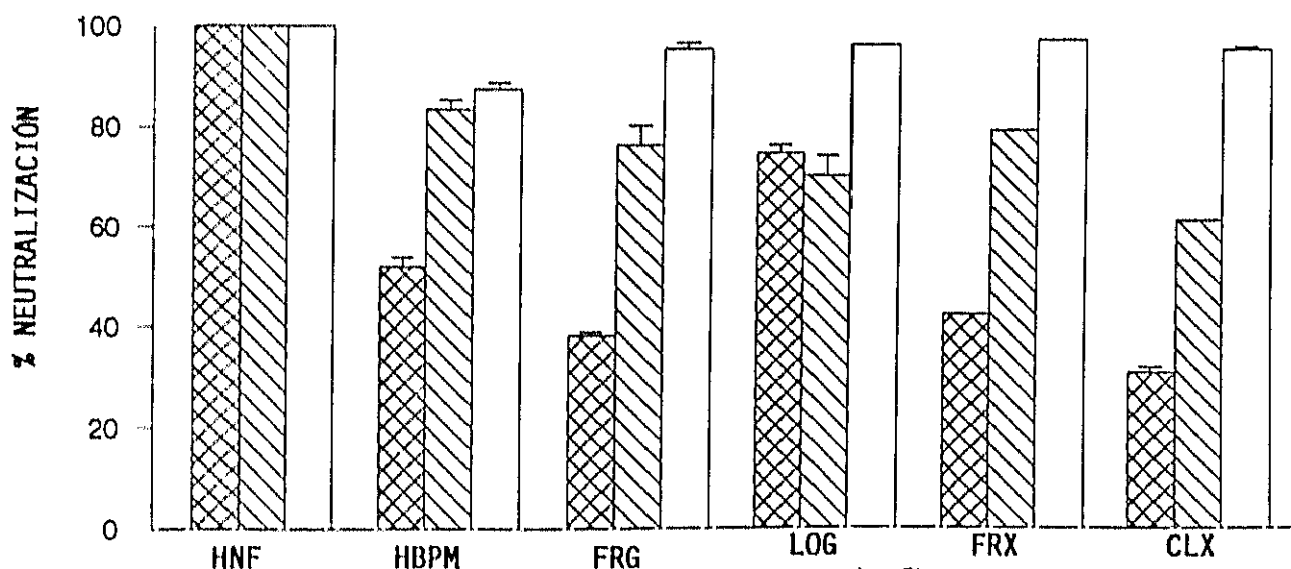


Figura 18

EFFECTO DE F4P (14 µg/ml)



EFFECTO DE F4P (25 µg/ml)



EFFECTO DE F4P (35 µg/ml)

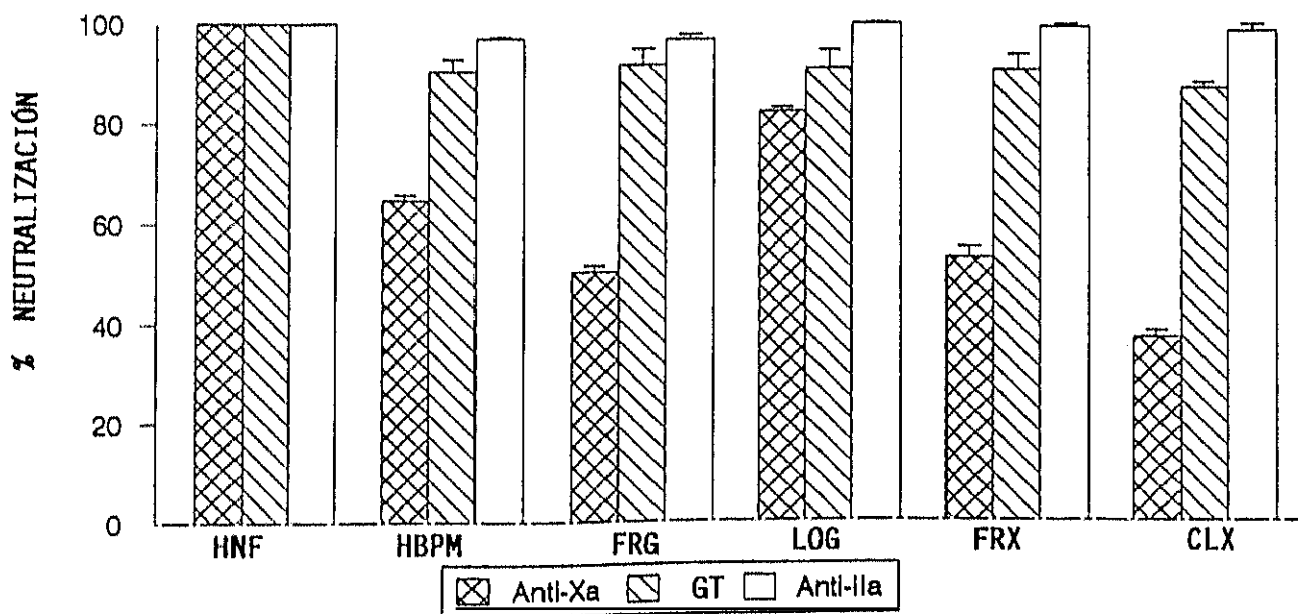


Figura 10

el grado de neutralización en los tres métodos de ensayo. La actividad anti-Xa se neutralizó en mucha menor proporción que la actividad anti-IIa y, excepto para Logiparin, la neutralización en el ensayo de generación de trombina se encontró entre las proporciones observadas para los ensayos anti-Xa y anti-IIa. No obstante pudo apreciarse claramente que la actividad de las HBPM, en el ensayo de generación de trombina, se neutraliza en menor proporción que en HNF.

Cuando se utilizó una concentración más elevada de F4P(R), 25  $\mu\text{g/ml}$ , todas las actividades de HNF(PI) se neutralizaron completamente al igual que las actividades anti-IIa de las cuatro HBPM comerciales. El grado de neutralización en el ensayo de generación de trombina se encontró entre 60 y 80%, mientras que se neutralizó menos del 50% de la actividad anti-Xa, con la excepción de Logiparin (fig. 19).

Al incrementarse la concentración de F4P a 35  $\mu\text{g/ml}$ , la diferencia de neutralización en el ensayo de generación de trombina entre HNF y las HBPM desapareció virtualmente, demostrándose una neutralización en torno al 90% de las HBPM. Sin embargo, con la excepción de Logiparin, una gran proporción de la actividad anti-Xa permaneció sin neutralizar. Los datos que soportan la fig. 19 se resumen en la tabla 25. Otros estudios mostraron que un 100% de neutralización de las HBPM podía alcanzarse en el ensayo de generación de trombina a 50  $\mu\text{g/ml}$  de F4P (datos no mostrados).

#### **IV.4.2 Efecto de F4P en Ensayos Anti-IIa con Plasma Desfibrinado**

Para tratar de explicar las diferencias de los resultados de neutralización entre el sistema de generación de trombina y los ensayos de actividad anti-IIa, se examinaron las diferencias en metodología: en los ensayos anti-IIa se había

NEUTRALIZACIÓN DE HNF Y DE LAS HBPM POR F4P

	14 $\mu$ g F4P			25 $\mu$ g F4P			35 $\mu$ g F4P		
	aXa	TG	alla	aXa	TG	alla	aXa	TG	alla
HNF 1 $\mu$ g	93.3 $\pm$ 3.6	80.4 $\pm$ 2.3	99.3 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 0.9	100 $\pm$ 1.3	100 $\pm$ 0.7	100 $\pm$ 1.8	100 $\pm$ 0.9	100 $\pm$ 0.2
HBPM 2 $\mu$ g	32.3 $\pm$ 0.1	45.2 $\pm$ 3.4	63.4 $\pm$ 1.2	51.9 $\pm$ 1.9	83.5 $\pm$ 2.0	87.6 $\pm$ 1.2	64.7 $\pm$ 0.9	90.3 $\pm$ 2.5	97.19 $\pm$ 0.3
FRG 3 $\mu$ g	23.8 $\pm$ 0.7	46.5 $\pm$ 3.5	75.9 $\pm$ 2.4	38.3 $\pm$ 0.7	76.4 $\pm$ 3.9	95.6 $\pm$ 1.1	50.4 $\pm$ 1.1	91.7 $\pm$ 3.4	96.9 $\pm$ 0.8
LOG 3 $\mu$ g	51.8 $\pm$ 2.4	34.1 $\pm$ 2.3	70.3 $\pm$ 1.0	74.8 $\pm$ 1.6	70.2 $\pm$ 4.1	96.3 $\pm$ 0.0	82.2 $\pm$ 0.7	90.7 $\pm$ 3.7	99.7 $\pm$ 0.3
FRX 4 $\mu$ g	21.7 $\pm$ 2.8	65.4 $\pm$ 3.9	88.6 $\pm$ 0.1	42.4 $\pm$ 0.1	79.5 $\pm$ 0.0	97.6 $\pm$ 0.3	53.0 $\pm$ 2.2	90.4 $\pm$ 3.2	99.1 $\pm$ 0.5
CLX 5 $\mu$ g	18.1 $\pm$ 1.4	36.7 $\pm$ 2.3	83.7 $\pm$ 1.2	30.8 $\pm$ 0.9	61.3 $\pm$ 0.0	94.7 $\pm$ 0.5	37.3 $\pm$ 1.4	86.9 $\pm$ 1.9	98.3 $\pm$ 1.3

Tabla 25. Resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los materiales estudiados tras la adición de distintas concentraciones de F4P(R). Los resultados para el ensayo de generación de trombina se cuantificaron como porcentaje del área bajo la curva. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de un mínimo de dos experimentos para cada concentración de F4P.

utilizado ATIII purificada, y en el ensayo de generación de trombina, plasma desfibrinado. A fin de conseguir condiciones similares a las de éste último sistema, los ensayos anti-IIa se llevaron a cabo en presencia de 14  $\mu\text{g/ml}$  de F4P(R) utilizando plasma desfibrinado, en lugar de ATIII purificada (tabla 26).

#### ENSAYOS ANTI-IIa EN PLASMA DESFIBRINADO

	Anti-IIa (ATIII)	Anti-IIa (Plasma desfibrinado)
HNF(PI) 1 $\mu\text{g}$	99.3 $\pm$ 0.5	97.5 $\pm$ 0.0
HBPM(PI) 2 $\mu\text{g}$	63.4 $\pm$ 1.2	85.0 $\pm$ 0.5
FRAGMIN 3 $\mu\text{g}$	75.9 $\pm$ 2.4	70.7 $\pm$ 3.2
LOGIPARIN 3 $\mu\text{g}$	70.3 $\pm$ 1.0	45.3 $\pm$ 3.0
FRAXIPARINA 4 $\mu\text{g}$	88.6 $\pm$ 0.1	84.3 $\pm$ 1.3
CLEXANE 5 $\mu\text{g}$	83.7 $\pm$ 1.2	71.8 $\pm$ 1.3

Tabla 26. Porcentajes de neutralización encontrados para las distintas heparinas en el sistema de ensayo amidolítico anti-IIa, utilizando ATIII o plasma desfibrinado, en presencia de 14  $\mu\text{g}$  de F4P. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos, utilizando las concentraciones de HNF y HBPM indicadas.

El uso de plasma desfibrinado dió valores de neutralización de HNF y de las HBPM, por F4P, semejantes a los obtenidos en el sistema purificado con la excepción de nuevo de Logiparin en cuyo caso la neutralización se redujo de 70% a 45%, valor éste más próximo al obtenido en el ensayo de generación de trombina (34%).

#### **IV.4.3 Efecto de F4P en Ensayos Anti-Xa y Anti-IIa en presencia de Calcio**

Los ensayos amidolíticos para la determinación de las actividades anti-Xa y anti-IIa se realizan normalmente en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . Esto podría ser una razón para justificar las diferencias de neutralización por F4P(R), que se encontraron para HNF y las HBPM, entre estos ensayos y el sistema de generación de trombina en el cual se utilizó  $\text{CaCl}_2$ .

El efecto de una concentración fisiológica de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ , sobre las actividades anti-Xa y anti-IIa de HNF(PI) y de cinco HBPM diferentes, a las mismas concentraciones ya indicadas, se valoró utilizando ATIII purificada, en presencia y ausencia de una concentración fija (14  $\mu\text{g/ml}$ ) de F4P(R). Los ensayos con ATIII se realizaron en presencia y en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ .

Los ensayos realizados en presencia de  $\text{CaCl}_2$  3 mM indicaron una inhibición más elevada de factor Xa por ATIII, teniendo una influencia contraria sobre la inhibición de factor IIa (tabla 27). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de neutralización por F4P en presencia o ausencia de  $\text{CaCl}_2$  para ninguno de los dos sistemas de ensayo considerados.

#### **IV.4.4 Efecto de F4P en Ensayos Anti-IIa en presencia de Calcio y Fosfolípido**

A fin de explicar las diferencias de neutralización por F4P entre los ensayos anti-IIa y de generación de trombina, se consideró una tercera alternativa. Para acercarnos a las condiciones analíticas del ensayo de generación de trombina, los ensayos anti-IIa se llevaron a cabo en presencia de calcio y fosfolípido, utilizando dos concentraciones distintas de calcio, 25 mM y 3mM. La de 25 mM simularía la concentración molar de calcio en el ensayo de generación de trombina y 3 mM, las condiciones fisiológicas. El

EFEECTO DE  $\text{CaCl}_2$  3 mM EN AUSENCIA DE F4P

Anti-IIa						
	HNF	HBPM	FRG	LOG	FRX	CLX
ATIII	100	100	100	100	100	100
ATIII (3mM $\text{Ca}^{2+}$ )	94 ± 0.5	85 ± 2.0	96 ± 1.0	91 ± 0.5	79 ± 0.5	83 ± 0.0
Anti-Xa						
	HNF	HBPM	FRG	LOG	FRX	CLX
ATIII	100	100	100	100	100	100
ATIII (3mM $\text{Ca}^{2+}$ )	204 ± 8.7	148 ± 7.3	141 ± 7.0	169 ± 4.7	138 ± 2.7	134 ± 1.3

Tabla 27. Los valores de HNF y de las HBPM, en ausencia de calcio, se expresaron arbitrariamente como 100 %. El aumento (ensayos anti-Xa) o disminución (ensayos anti-IIa) de actividad tras la adición de calcio se estimó comparando concentraciones fijas de HNF y de las HBPM. Los datos que se recogen en la tabla representan la media de 3 ensayos distintos y sus errores estándar.



fosfolípido se utilizó a la misma concentración que para el ensayo de generación de trombina. Por último, para conseguir proporciones equivalentes al ensayo de generación de trombina, se utilizaron volúmenes iguales de ATIII (heparina/F4P), fosfolípido y calcio.

La influencia de calcio y fosfolípido en los ensayos anti-IIa, en presencia de 14  $\mu\text{g}$  de F4P, se estudió únicamente con 1  $\mu\text{g}$  de HNF (PI). Los valores de absorbancia para el control de HNF, en presencia y ausencia de calcio y fosfolípido, fueron los siguientes:

- Ausencia de fosfolípido y calcio	$0.392 \pm 4.9 \cdot 10^{-3}$
- Ausencia de calcio y presencia de fosfolípido	$0.392 \pm 8.3 \cdot 10^{-3}$
- Presencia de calcio y ausencia de fosfolípido	$0.378 \pm 3.6 \cdot 10^{-3}$
- Presencia de fosfolípido y calcio	$0.377 \pm 8.7 \cdot 10^{-3}$

Las lecturas de absorbancia obtenidas cuando 1  $\mu\text{g}$  de HNF se ponía en presencia de 14  $\mu\text{g}$  de F4P, en las condiciones diseñadas para el ensayo (presencia de calcio y fosfolípido), dieron valores de  $0.648 \pm 2.36 \cdot 10^{-3}$ . Se observaron asimismo los valores de absorbancia de las mezclas de reacción en ausencia de HNF y F4P y en ausencia de HNF y presencia de F4P, que resultaron  $0.655 \pm 5.04 \cdot 10^{-3}$ . Este valor representa la lectura máxima de absorbancia, cuando toda la trombina adicionada está presente.

Por consiguiente, el porcentaje de neutralización de HNF en este sistema de ensayo, no mostró ninguna diferencia con resultados previos en ausencia de calcio y fosfolípido. Los datos tampoco mostraron ninguna diferencia significativa cuando se utilizaron las concentraciones de 25 mM ó 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Los resultados observados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

#### IV.4.5 Discusión

De los experimentos recogidos en esta sección pueden extraerse una serie de importantes conclusiones :

La primera es que las HBPM son más resistentes que HNF a la neutralización por 14  $\mu\text{g/ml}$  de F4P, cuando se valoran a concentraciones que producen la misma actividad biológica en un sistema de generación de trombina en PPP. Sin embargo, esta diferencia se debe fundamentalmente a las más altas concentraciones de las HBPM requeridas para alcanzar la misma actividad biológica que en el caso de HNF.

Por otro lado, aunque las actividades de las HBPM en el ensayo de generación de trombina estaban bien correlacionadas con sus actividades anti-IIa (sec. IV.2), el grado de neutralización por F4P fue inferior en el ensayo de generación de trombina que en los ensayos anti-IIa (fig. 19). Examinada la posibilidad de que los distintos grados de neutralización se debieran a diferencias metodológicas, entre el sistema de generación de trombina y los ensayos amidolíticos, parece que las diferencias obtenidas entre los tres sistemas de ensayo diferentes anti-Xa, anti-IIa y generación de trombina eran genuínas y las razones tienen que ser analizadas.

Volviendo a los resultados de la fig. 19, la actividad residual anti-Xa de las HBPM, que no es neutralizada por altas concentraciones de F4P, debe suponer una contribución menor a la inhibición de la generación de trombina, al menos en el sistema de ensayo que se utilizó. Los resultados en presencia de F4P también indican que una porción de su actividad anti-Xa, que es más resistente a la neutralización por F4P, debe contribuir a la inhibición de generación de trombina y esta porción fue más elevada para la mayoría de las

HBPM que para la HNF. Esta observación podría ser particularmente importante *in vivo* en condiciones en las que es posible la activación de plaquetas. Otros estudios de las actividades de las HBPM, en presencia de plaquetas, se describen en la sección siguiente.

## IV.5 INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA POR HNF Y HBPM EN PRP

Los experimentos descritos en la sección anterior trataban de investigar el efecto del F4P purificado sobre la inhibición de generación de trombina por HNF y por distintas HBPM. No obstante, otras interacciones podían afectar sus actividades anticoagulantes al utilizar plaquetas enteras. La relativa importancia de la activación de plaquetas, sobre la inhibición de generación de trombina de estos preparados en el sistema intrínseco, se estudió en una mezcla de reacción tan semejante como fue posible al PRP.

Los objetivos de este estudio fueron en primer lugar, medir la capacidad de la HNF y de las varias HBPM para inhibir la generación de trombina en PRP y comparar estos resultados con los efectos previamente encontrados en PPP, en ausencia y presencia de F4P. En segundo lugar, estudiar la relación entre la potencia inhibitoria de generación de trombina en PRP y las actividades anti-Xa y anti-IIa determinadas en ensayos amidolíticos.

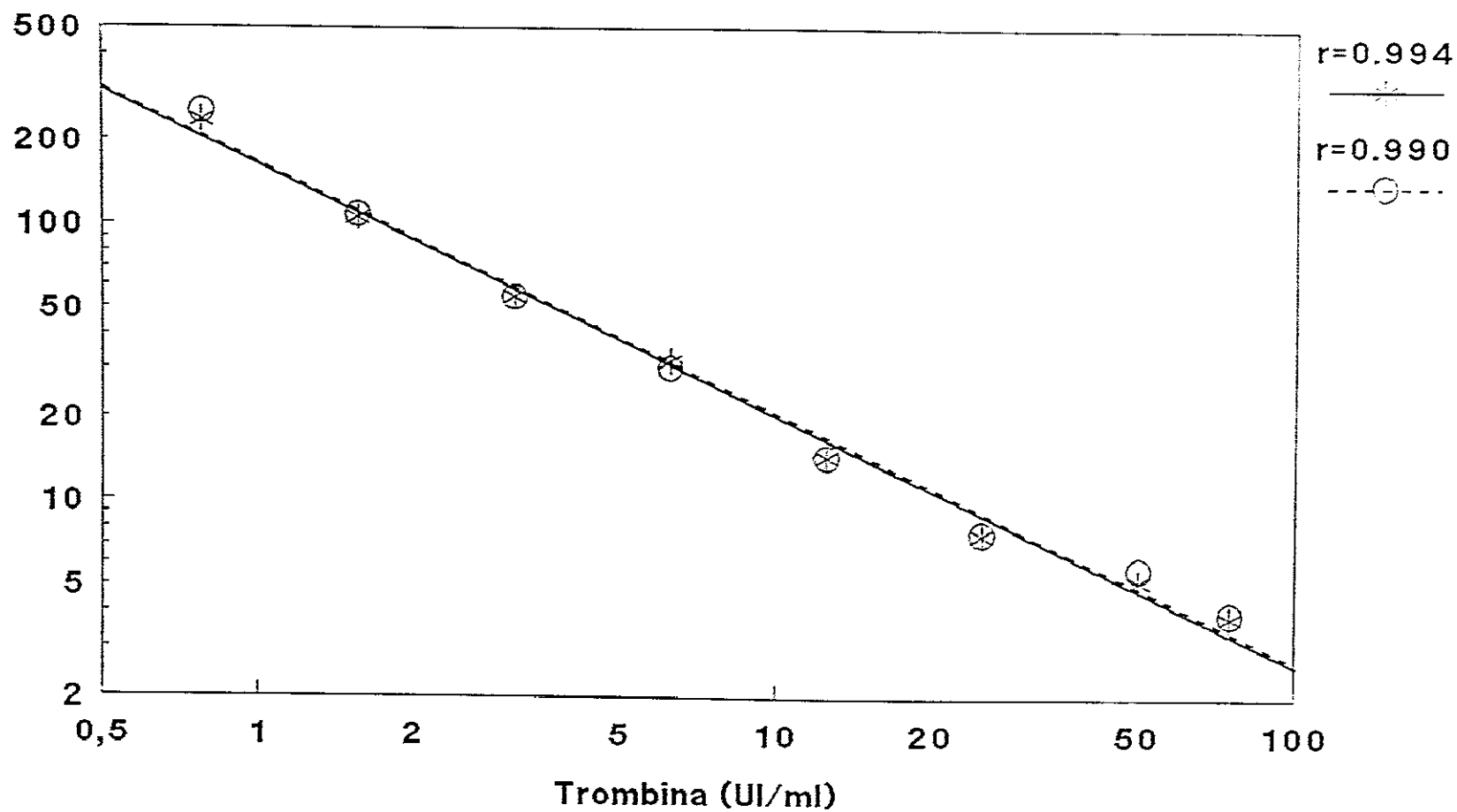
### IV.5.1 Curva Trombina-Fibrinógeno

En estos experimentos se incluyeron dos lotes diferentes de fibrinógeno: el lote FN119 ya utilizado en los experimentos de generación de trombina en PPP y un nuevo lote, el FN121. El nuevo lote se calibró frente al primer patrón internacional de  $\alpha$ -trombina, siguiendo el mismo método que para el lote FN119 (pág. 73). Se valoró un rango de concentraciones de 75 UI a 0.78 UI/ml de trombina.

La figura 20 muestra la curva de calibración obtenida cuando los valores de los tiempos de coagulación de dos ensayos independientes se combinaron

CURVA TROMBINA - FIBRINÓGENO  
Fibrinógeno (Lote 121)/Alpha-Trombina (PI)

T<sub>9</sub> de Coagulación (seg)



y representaron frente a las unidades de trombina en un sistema log-log. La pendiente e intersección con el eje de ordenadas de esta curva resultaron ser -0.97609 y 2.24852 respectivamente. En un ensayo con un pequeño rango de concentraciones se comprobó asimismo que no existían diferencias a causa del uso del patrón internacional de  $\alpha$ -trombina (89/581), en lugar del patrón internacional de trombina (70/157) que se había tomado como referencia para la calibración del lote anterior de fibrinógeno, FN119.

Al igual que en el caso del lote FN119, los datos obtenidos en la calibración del lote FN121 se introdujeron en un programa informático (ver sec. métodos pág. 85) para calcular la trombina producida en cada ensayo de generación de trombina, cuando se utilizaba el referido lote.

#### **IV.5.2 Generación de trombina en PRP**

La generación de trombina, activada por contacto con una superficie de vidrio, se midió en PRP en presencia de varias concentraciones de HNF y de cinco HBPM diferentes. Para cada material investigado se utilizaron muestras de PRP de 4 a 7 donadores, a fin de recoger la variabilidad entre los individuos. Un total de 33 donadores distintos se incluyeron en el estudio. Con cada muestra de PRP se desarrollaron curvas dosis-respuesta de las preparaciones analizadas. Un máximo de seis curvas se realizaron en cada serie de ensayos y al menos dos experimentos independientes se efectuaron para cada una de las concentraciones de HNF o de las HBPM ensayadas.

Como se verá en las curvas presentadas a lo largo de esta sección, en PRP en ausencia de heparina se generó una respuesta espontánea de trombina, de concentración máxima 30 a 50 UI/ml, después de un tiempo de alrededor de 4 a 5 minutos desde su recalcificación. El recuento de plaquetas

de las muestras de PRP utilizadas, cubrió un rango de factor 2:  $2.2 \times 10^9$  a  $5.3 \times 10^9$ .

La influencia de distintas concentraciones de plaquetas sobre la producción de trombina se valoró en experimentos preliminares, diluyendo muestras de PRP en PPP del mismo donador. El proceso de dilución no modificó el comportamiento del plasma en los ensayos (fig. 21), pero diluciones superiores a 1/2, a partir de una muestra media de PRP ( $3.8 \times 10^9$  plaquetas/ml), redujeron la curva de trombina y la concentración del pico de trombina, o en otras palabras, la cantidad de trombina formada. Puesto que uno de los principales objetivos del estudio era encontrar una relación dosis-respuesta de los materiales ya enunciados en un sistema de generación de trombina que utilizaba PRP, y con el fin de reproducir las mejores condiciones fisiológicas *in vitro*, no se consideró necesario añadir PPP a PRP para compensar las diferencias entre las concentraciones de plaquetas en las muestras. Por consiguiente, todos los experimentos se realizaron con PRP no diluido y el recuento de plaquetas se realizó únicamente para tener la información del rango de concentración que estaba siendo utilizado.

Las muestras de PRP se valoraron al comienzo y en la mayoría de los casos al final de cada serie de ensayos, a fin de evaluar la estabilidad de cada muestra de plasma utilizada. Una tendencia a la reducción de la fase de retraso en la aparición del pico de trombina, así como a la disminución de la cantidad de trombina generada, aparecía frecuentemente después de un período de tiempo de 2h30' [(fig. 21, curva (■)); este hecho se consideró debido a la presencia de una mayor concentración de fosfolípidos procoagulantes en la mezcla de reacción, a causa de la rotura de plaquetas. La duración de cada serie de ensayos, con la misma muestra de PRP, no fue nunca superior a 2h30'.

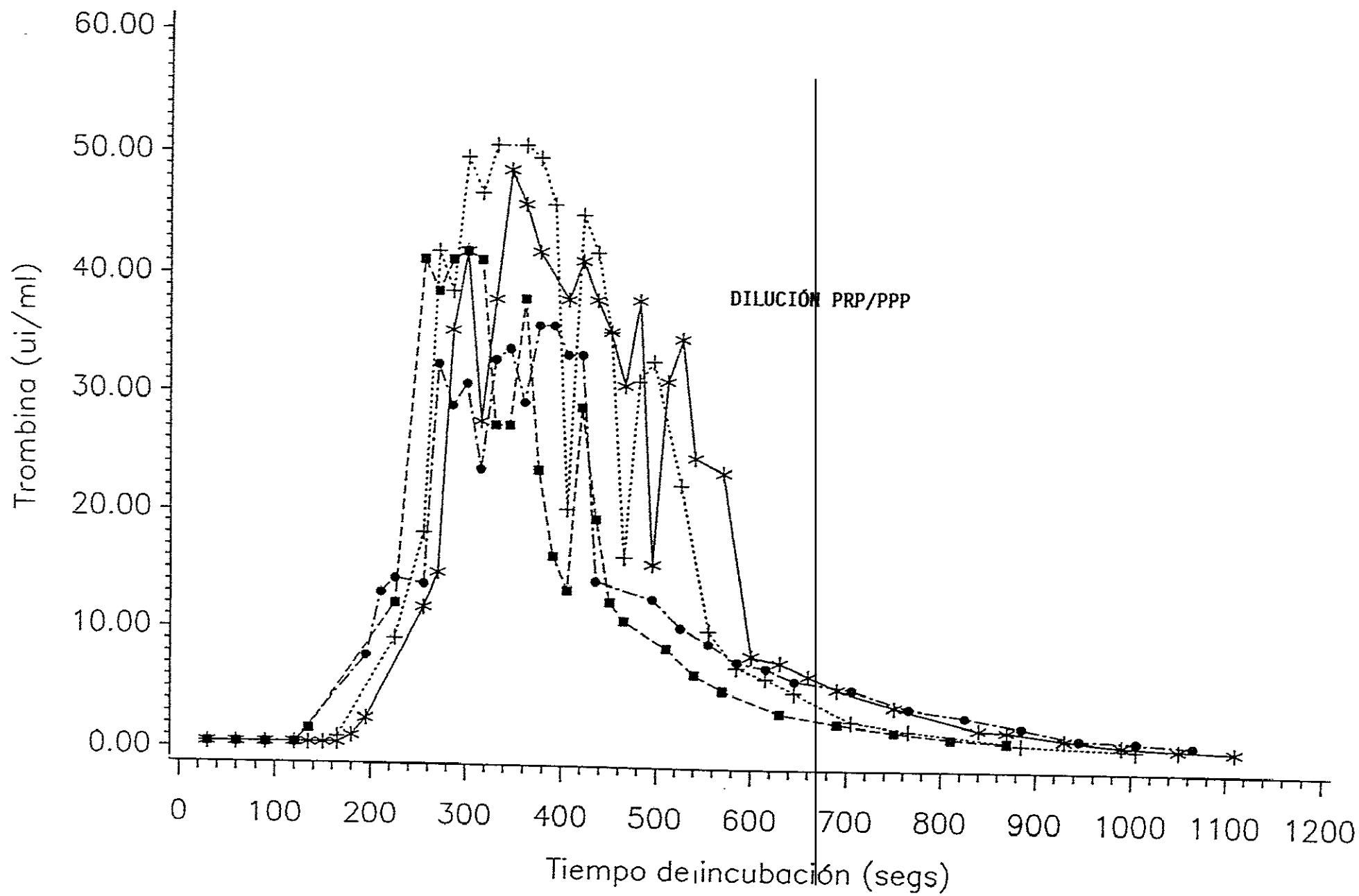


Figura 21



De los 33 donadores incluidos en los experimentos, se obtuvieron muestras de PRP de 5 de ellos en dos días diferentes para evaluar distintas preparaciones. Las variaciones del total de trombina generada por las muestras del mismo donador en dos días distintos (tabla 28) fueron similares a las encontradas en muestras de distintos donadores.

**VARIACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS Y TROMBINA GENERADA EN DONADORES REPETIDOS**

DONADOR	Nº PLAQUETAS (x10 <sup>9</sup> )	TROMBINA GENERADA	MATERIAL ESTUDIADO
K.R.	4.0	10086	CLX
"	3.8	6526	FRG
W.O.	3.7	6286	HBPM
"	3.1	9522	FRG
T.W.	3.3	7925	HBPM
"	3.6	10383	FRG
J.P.	2.4	7285	HNF
"	2.9	10886	CLX
J.W.	3.2	7280	CLX
"	3.7	7388	LOG

Tabla 28. Número de plaquetas y trombina total generada (valor absoluto del área de la curva de trombina), obtenidas en muestras de PRP de donadores repetidos en dos días distintos.

A fin de mantener las muestras de PRP lo más estables posible durante el tiempo del ensayo se compararon también muestras almacenadas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>, con muestras del mismo donador mantenidas a temperatura ambiente. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de trombina generada por el PRP. Por razones prácticas y de rapidez de los ensayos, todas las muestras de PRP utilizadas para evaluar el efecto de HNF y de las HBPM se mantuvieron a temperatura ambiente.

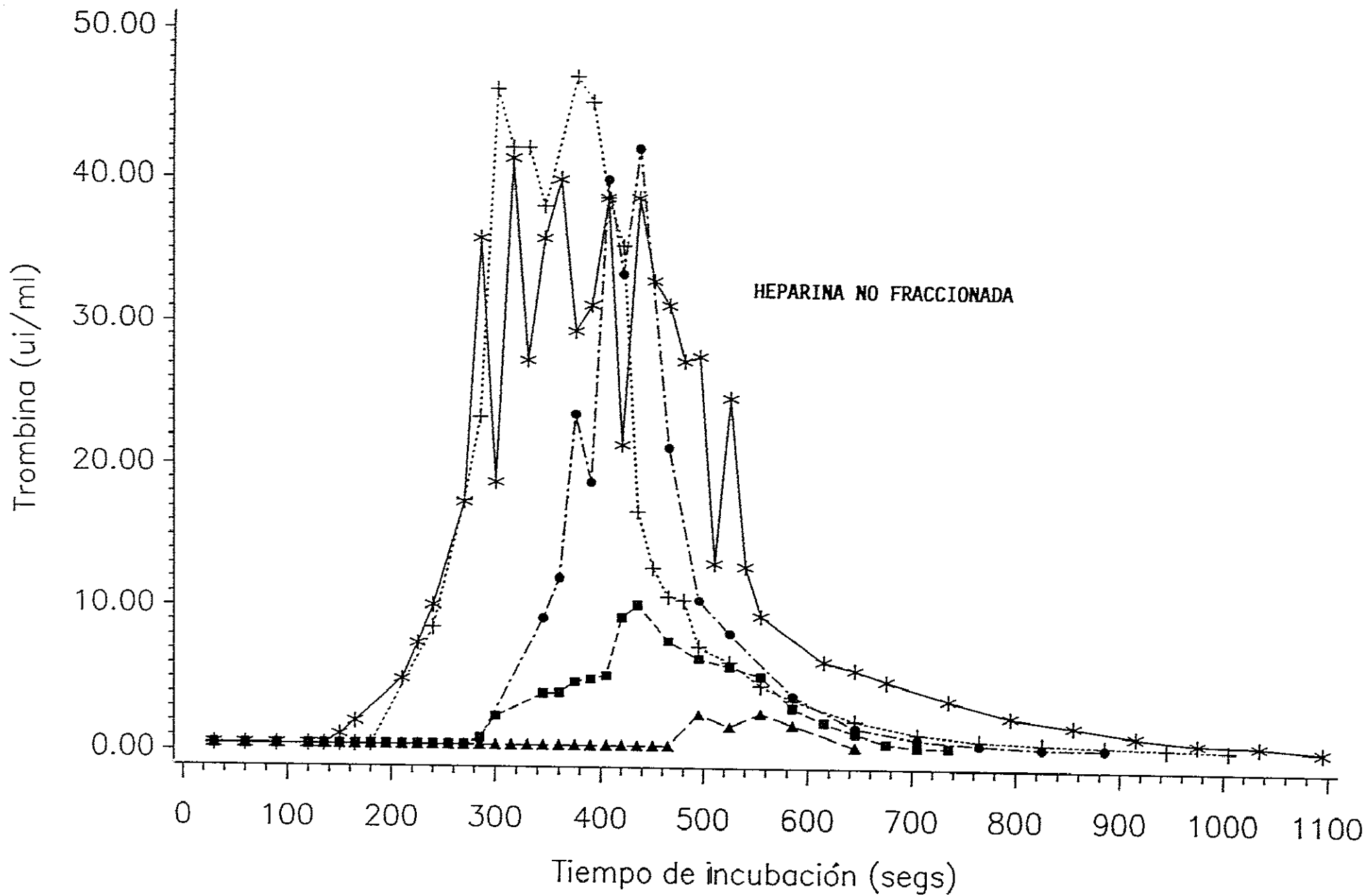
Al igual que en el sistema de PPP, la inhibición de generación de

trombina se cuantificó en términos del área bajo la curva de trombina y de la concentración máxima de trombina obtenidas, expresadas en ambos casos como porcentaje de los valores encontrados para el plasma control, que fueron estimados como 100%. No obstante, los resultados concluyentes de actividad y potencia de las heparinas analizadas se han calculado tomando como base únicamente los porcentajes del área bajo la curva, por estimarse más fiables y reproducibles. Ya se indicó en la sección IV.2 que el porcentaje del pico de trombina, en relación al del plasma control, hace depender la evaluación de los ensayos de valores "únicos", dando la posibilidad de mayores errores o variaciones. Este hecho es de particular importancia en los ensayos en PRP, puesto que las muestras proceden de donadores individuales.

Los resultados de actividad se expresaron como CE50, cantidad de HNF o de HBPM, en  $\mu\text{g}$  por ml de plasma, necesaria para producir el 50% de inhibición de generación de trombina con relación al plasma control. Las actividades inhibitorias de las HBPM comerciales se obtuvieron también en términos de potencia frente a los patrones internacionales de HNF y HBPM.

#### **IV.5.3 Inhibición de generación de trombina por HNF (PI)**

Cuando se añadió HNF a PRP, a la concentración de  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , la fase de retraso en la aparición del pico de trombina, con respecto a la del plasma control, fue sólo ligeramente prolongada y apenas se observó ninguna disminución de la cantidad de trombina generada en comparación con el plasma no heparinizado (fig. 22). La media de los valores máximos de trombina obtenidos para el plasma control en estos ensayos, fue  $46.0 \pm 3.7 \text{ UI}/\text{ml}$ . A medida que se aumentó la concentración de HNF se observó un retraso en la aparición del pico de trombina, además de la disminución en la generación de trombina (tabla 29).



## INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA POR HNF(PI) EN PPP Y PRP

HNF $\mu\text{g/ml}$	PRP (%)		PPP (%)	
	Area Curva Trombina	Pico de Trombina	Area Curva Trombina	Pico de Trombina
0.25	-	-	$63.5 \pm 3.6$	$89.7 \pm 3.2$
0.5	-	-	$34.0 \pm 2.9$	$57.0 \pm 5.0$
1	$77.6 \pm 2.9$	$96.4 \pm 9.5$	$18.5 \pm 1.4$	$23.6 \pm 2.6$
2	$41.7 \pm 8.9$	$89.4 \pm 10.5$	$9.8 \pm 2.3$	$8.3 \pm 0.3$
3	$16.0 \pm 2.0$	$28.0 \pm 3.3$	-	-
4	$5.0 \pm 0.0$	$4.8 \pm 0.0$	-	-

Tabla 29. Los datos corresponden a las curvas dosis-respuesta obtenidas en el sistema de generación de trombina en PRP y PPP y expresan las medias  $\pm$  error estándar de los experimentos realizados con cada concentración de HNF.

Para estudiar el efecto de HNF en PRP, se midieron trece curvas distintas de generación de trombina, en un rango de concentraciones que variaba entre 1 y 4  $\mu\text{g/ml}$ . Se encontró buena reproducibilidad y buena linealidad ( $r^2 = 0.996$ ) de la curva dosis-respuesta desarrollada en base al área de la curva de trombina, y a partir de ella (tabla 29) se cuantificó la actividad de HNF que se expresó como CE50, encontrándose un valor de 1.67 $\mu\text{g/ml}$ .

### IV.5.4 Inhibición de generación de trombina por HBPM (PI)

Al igual que la HNF, el HBPM(PI) producía un incremento de la inhibición de trombina dependiente de la dosis, cuando se valoró en el sistema de generación de trombina en PRP (fig. 23, tabla 30). Sin embargo, al aumentar la concentración del HBPM(PI) no se hizo evidente ningún retraso en la aparición del pico de trombina. Se midieron 16 curvas de generación de trombina distintas en el rango de concentración estudiado. La media de los valores máximos de trombina, observados para el control de plasma en estos ensayos, fue de  $38.8 \pm 3.6$  UI.

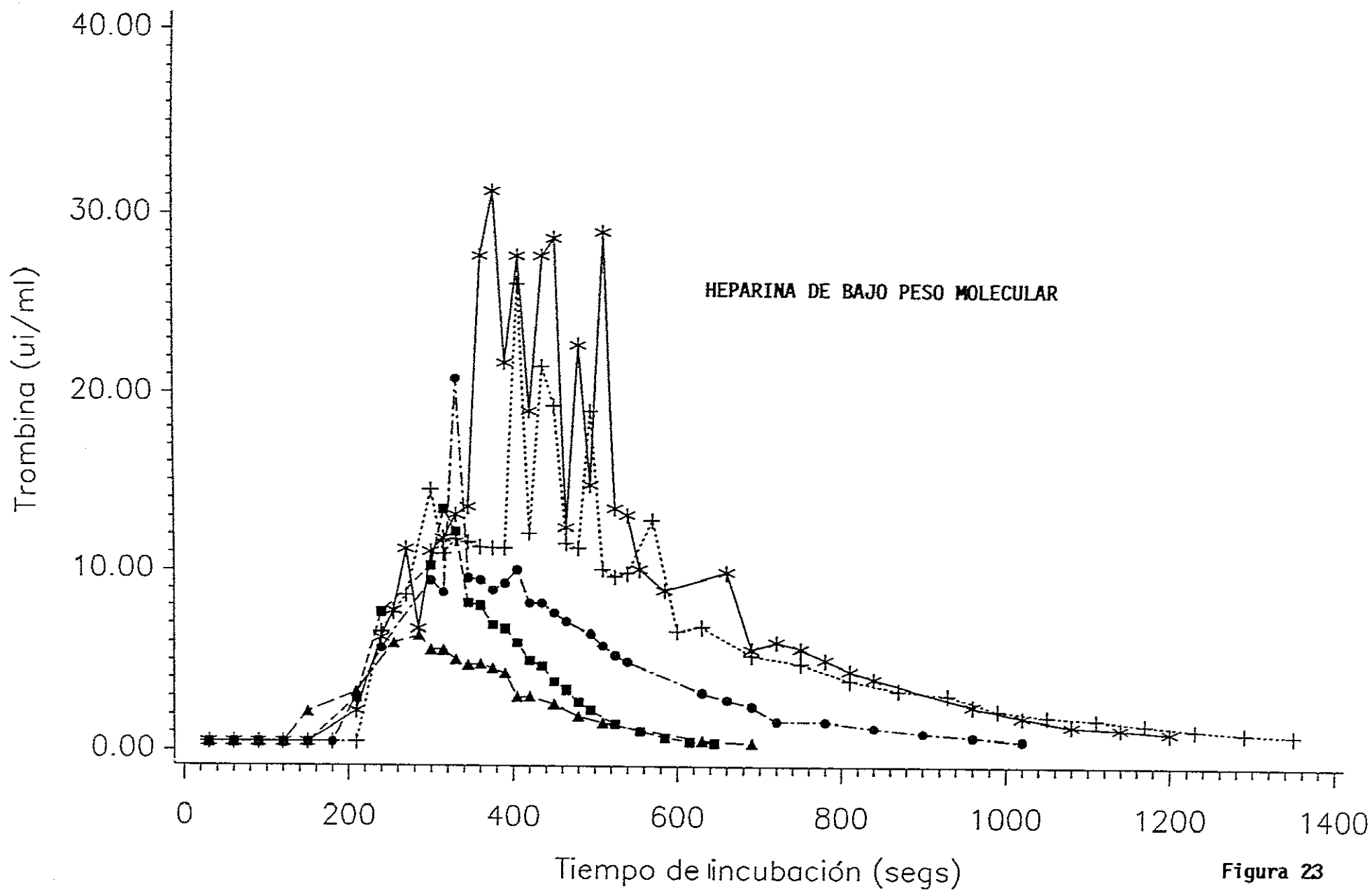


Figura 23

## INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA POR HBPM(PI) EN PRP Y PPP

HBPM $\mu\text{g/ml}$	PRP (%)		PPP (%)	
	Area Curva Trombina	Pico de Trombina	Area Curva Trombina	Pico de trombina
0.5	-	-	57.0 $\pm$ 2.6	89.3 $\pm$ 0.2
1	80.8 $\pm$ 0.2	-	32.7 $\pm$ 3.4	73.8 $\pm$ 5.4
2	46.2 $\pm$ 3.6	62.8 $\pm$ 15.9	20.0 $\pm$ 1.4	45.7 $\pm$ 4.1
3	23.9 $\pm$ 4.4	35.9 $\pm$ 10.6	-	-
4	14.1 $\pm$ 2.5	15.7 $\pm$ 2.7	11.0 $\pm$ 0.0	18.1 $\pm$ 3.7

Tabla 30. Porcentaje de trombina generada en la curva dosis-respuesta obtenida cuando se analizaron distintas concentraciones del patrón de HBPM en PPP y PRP. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar.

La curva dosis-respuesta desarrollada en base a los datos del área de la curva de trombina mostraba una buena linealidad ( $r^2 = 0.996$ ) y la actividad se estimó en unidades CE50, como en el caso del HNF(PI), obteniéndose un valor de 1.85  $\mu\text{g/ml}$ . Observando este valor, el HBPM(PI) parece ser casi tan potente como HNF(PI) cuando se valoró en PRP.

Se calculó asimismo la potencia del patrón de HBPM frente a HNF (PI), a partir de un análisis de líneas paralelas, comparando las dos curvas dosis-respuesta obtenidas en el sistema PRP (tablas 29 y 30). Un resultado similar al calculado en términos de CE50 se obtuvo al estimar la potencia del HBPM(PI), resultando 90% de la actividad del HNF(PI).

### IV.5.5 Inhibición de generación de trombina por HBPM comerciales

Las cuatro HBPM comerciales estudiadas mostraron diferentes modelos de inhibición cuando se analizaron en PRP (Figs. 24, 25, 26 y 27), al igual que sucedió en los ensayos de PPP. La diferente capacidad de estas HBPM para inhibir la generación de trombina en PRP se muestra en la tabla 31.

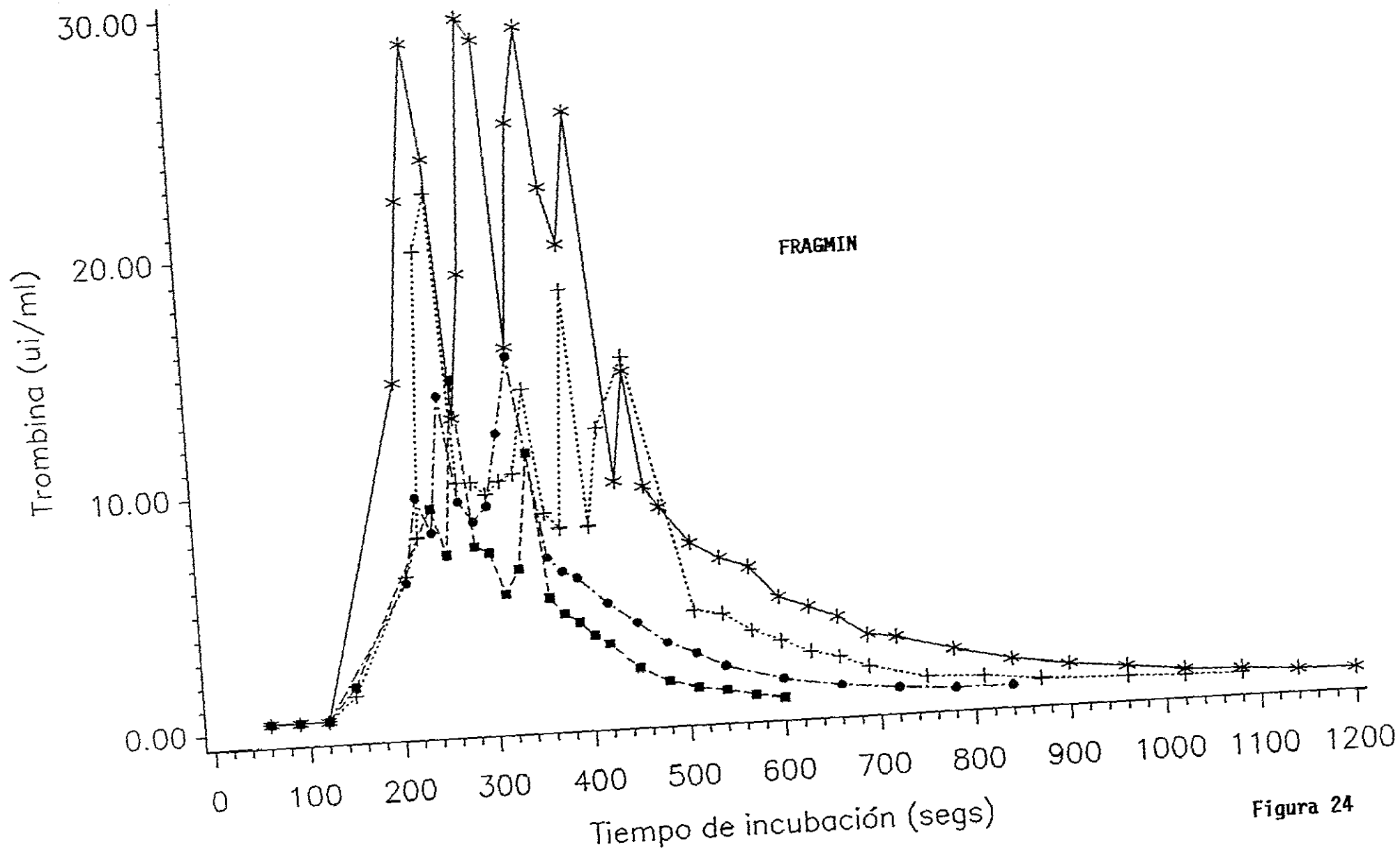
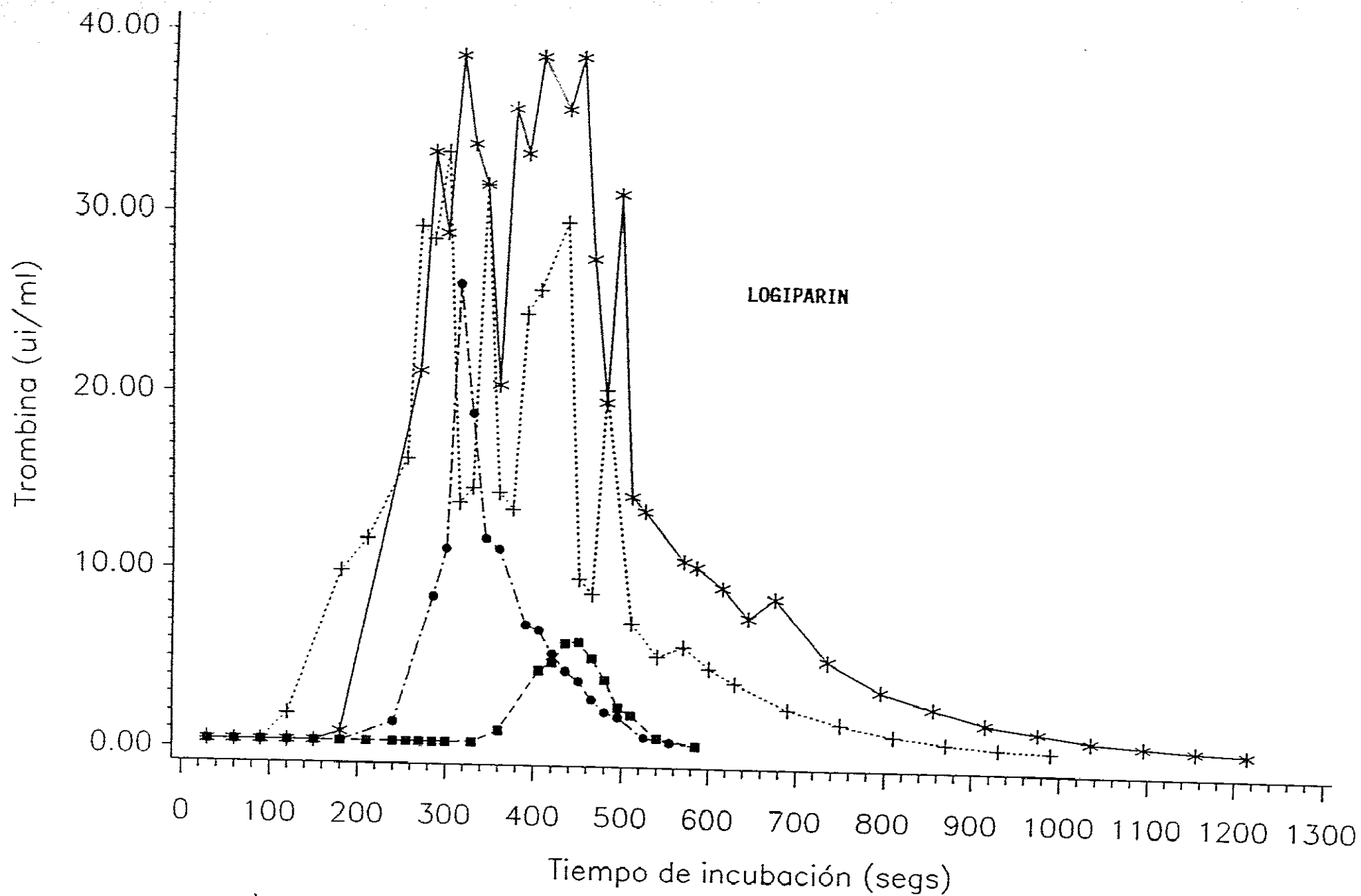


Figura 24



--\*-- PRP --+-- PRP + LOG 1 ug -●- PRP + LOG 3 ug -■- PRP + LOG 5 ug

Figura 25



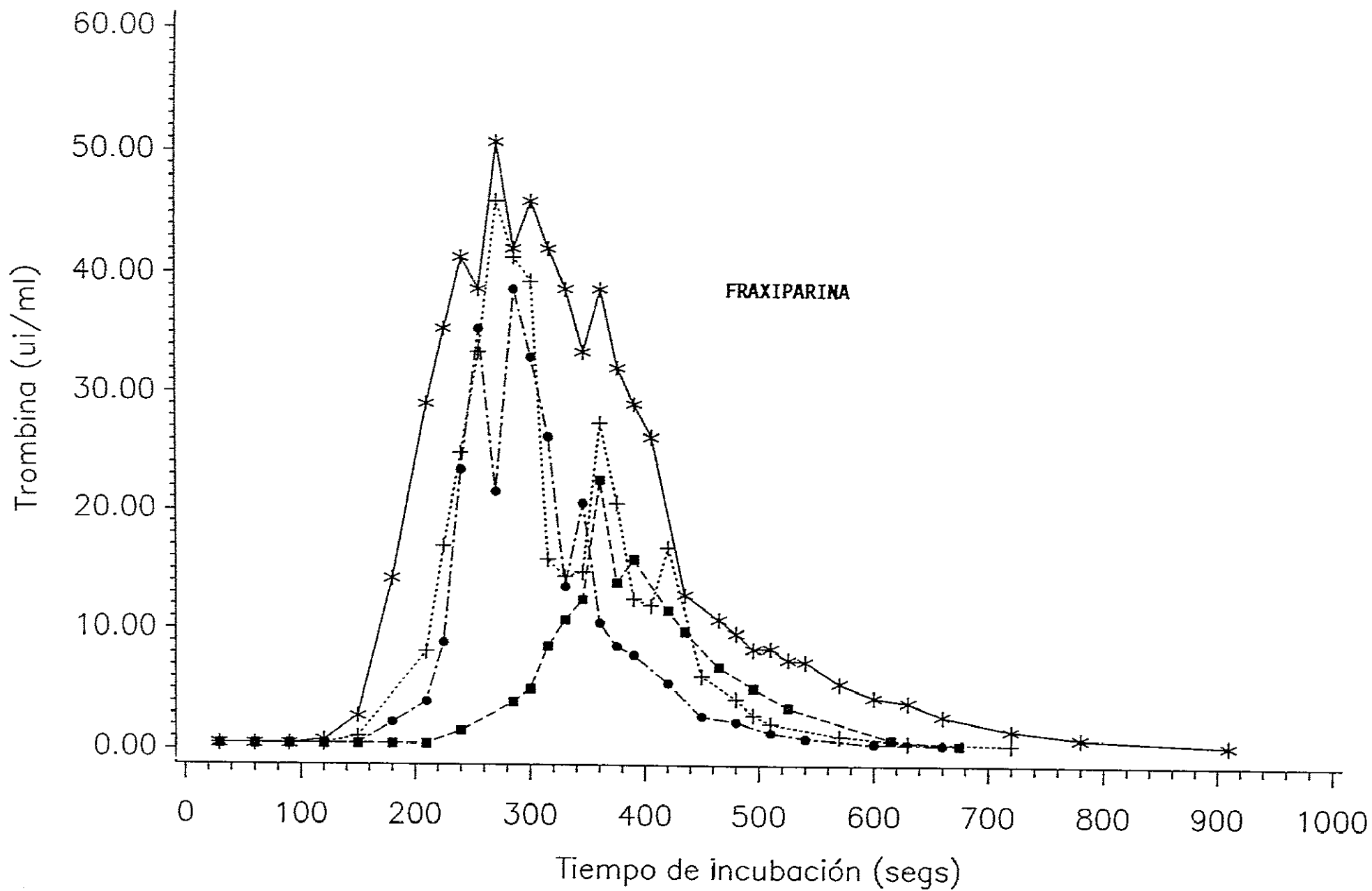


Figura 26

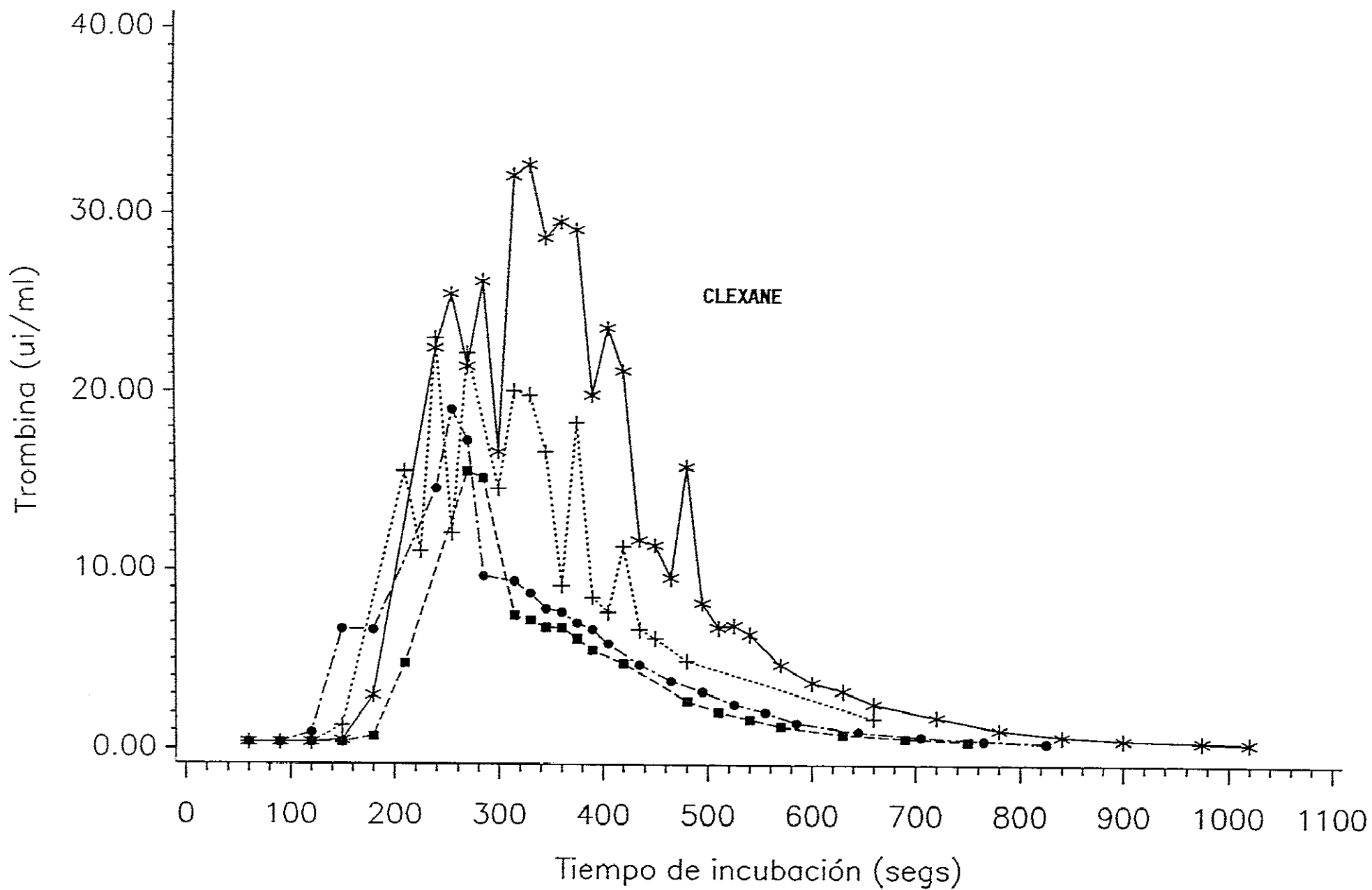


Figura 27

**INHIBICIÓN DE GENERACIÓN DE TROMBINA POR HBPM COMERCIALES  
EN PPP Y PRP**

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Trombina Generada (%)			
	PRP		PPP	
	Area Curva Trombina	Pico de Trombina	Area Curva Trombina	Pico de Trombina
[FRG]				
1	-	-	41.0 $\pm$ 4.4	72.8 $\pm$ 8.3
2	62.5 $\pm$ 12.5	74.8 $\pm$ 1.2	25.0 $\pm$ 3.8	54.2 $\pm$ 9.9
3	33.5 $\pm$ 3.6	53.8 $\pm$ 14.3	17.8 $\pm$ 2.7	33.1 $\pm$ 3.5
4	24.0 $\pm$ 0.0	37.1 $\pm$ 6.0	13.3 $\pm$ 0.7	26.6 $\pm$ 1.5
5	12.0 $\pm$ 2.3	3.6 $\pm$ 3.2	11.0 $\pm$ 0.0	22.0 $\pm$ 0.0
[LOG]				
1	-	-	44.7 $\pm$ 3.8	77.2 $\pm$ 2.2
2	56.0 $\pm$ 0.0	91.8 $\pm$ 5.1	25.5 $\pm$ 5.5	45.2 $\pm$ 2.2
3	36.4 $\pm$ 4.0	66.8 $\pm$ 9.9	15.8 $\pm$ 0.4	36.5 $\pm$ 7.0
4	17.7 $\pm$ 2.2	32.7 $\pm$ 13.9	13.5 $\pm$ 0.5	23.7 $\pm$ 7.2
5	8.0 $\pm$ 0.0	15.0 $\pm$ 0.0	-	-
[FRX]				
1	-	-	59.0 $\pm$ 4.2	99.0 $\pm$ 4.0
2	-	-	41.2 $\pm$ 7.0	76.5 $\pm$ 8.6
3	55.0 $\pm$ 0.0	67.4 $\pm$ 13.6	27.3 $\pm$ 3.0	61.0 $\pm$ 5.0
4	44.0 $\pm$ 4.4	68.2 $\pm$ 12.2	19.2 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 3.0
5	32.5 $\pm$ 3.7	55.1 $\pm$ 13.0	17.0 $\pm$ 0.0	31.0 $\pm$ 0.0
6	22.7 $\pm$ 3.7	25.9 $\pm$ 6.2	-	-
[CLX]				
1	-	-	65.0 $\pm$ 2.0	91.5 $\pm$ 1.5
2	-	-	47.5 $\pm$ 2.5	79.5 $\pm$ 5.5
3	64.0 $\pm$ 7.9	65.2 $\pm$ 6.7	29.5 $\pm$ 3.5	59.5 $\pm$ 5.5
4	55.0 $\pm$ 1.5	70.1 $\pm$ 2.1	24.0 $\pm$ 1.0	41.0 $\pm$ 1.4
5	39.8 $\pm$ 6.3	47.0 $\pm$ 13.5	19.5 $\pm$ 1.3	34.9 $\pm$ 2.5
6	35.5 $\pm$ 3.5	52.7 $\pm$ 11.1	-	-
7	26.0 $\pm$ 7.7	27.5 $\pm$ 11.7	-	-

Tabla 31. Generación de trombina en PRP y PPP, en presencia de varias concentraciones de HBPM comerciales (media  $\pm$  error estándar).

Se desarrolló una curva dosis-respuesta para cada una de las heparinas estudiadas. Estos datos se representaron en un sistema log dosis-respuesta (fig. 28), incluyendo también las rectas dosis-respuesta obtenidas para las preparaciones del HNF(PI) y del HBPM(PI). Todas ellas demostraron ser lineales, con valores  $r^2$  de 0.982 (FRG), 0.996 (LOG), 0.997 (FRX) y 0.979 (CLX). Se midieron 21 curvas distintas de generación de trombina para FRG y FRX y 17 en los casos de LOG y CLX, dentro del rango de concentración escogido. La media de los máximos de trombina (UI/ml) para el plasma control en cada serie de experimentos fue:  $30.3 \pm 3.0$  (FRG),  $39.1 \pm 2.6$  (LOG),  $36.3 \pm 4.6$  (FRX) y  $34.0 \pm 2.1$  (CLX).

Los valores CE50 calculados para cada preparación a partir de las curvas dosis-respuesta (fig. 28) se muestran en la tabla 32, junto con los datos obtenidos para HNF(PI) y HBPM(PI), en comparación con los valores previamente obtenidos para PPP. Las cantidades de las HBPM comerciales, requeridas para obtener el 50% de inhibición de trombina, variaron desde aproximadamente 1.1 a 2.5 veces la cantidad necesaria para obtener la misma inhibición por HNF.

#### VALORES DE CE50 EN PRP Y PRP

	PRP	PPP	PRP/PPP
HNF (PI)	1.67	0.33	5.1
HBPM (PI)	1.85	0.60	3.1
FRAGMIN	2.43	0.83	2.9
LOGIPARIN	2.26	0.92	2.5
FRAXIPARINA	3.41	1.37	2.5
CLEXANE	4.22	1.59	2.6

Tabla 32. Los resultados indican la concentración necesaria ( $\mu\text{g/ml}$ ) de cada una de las heparinas para producir 50% de inhibición de trombina en PRP y PPP. Los datos se han calculado en base al área de las curvas de trombina.

# GENERACIÓN DE TROMBINA EN PRP

Trombina Generada (%)

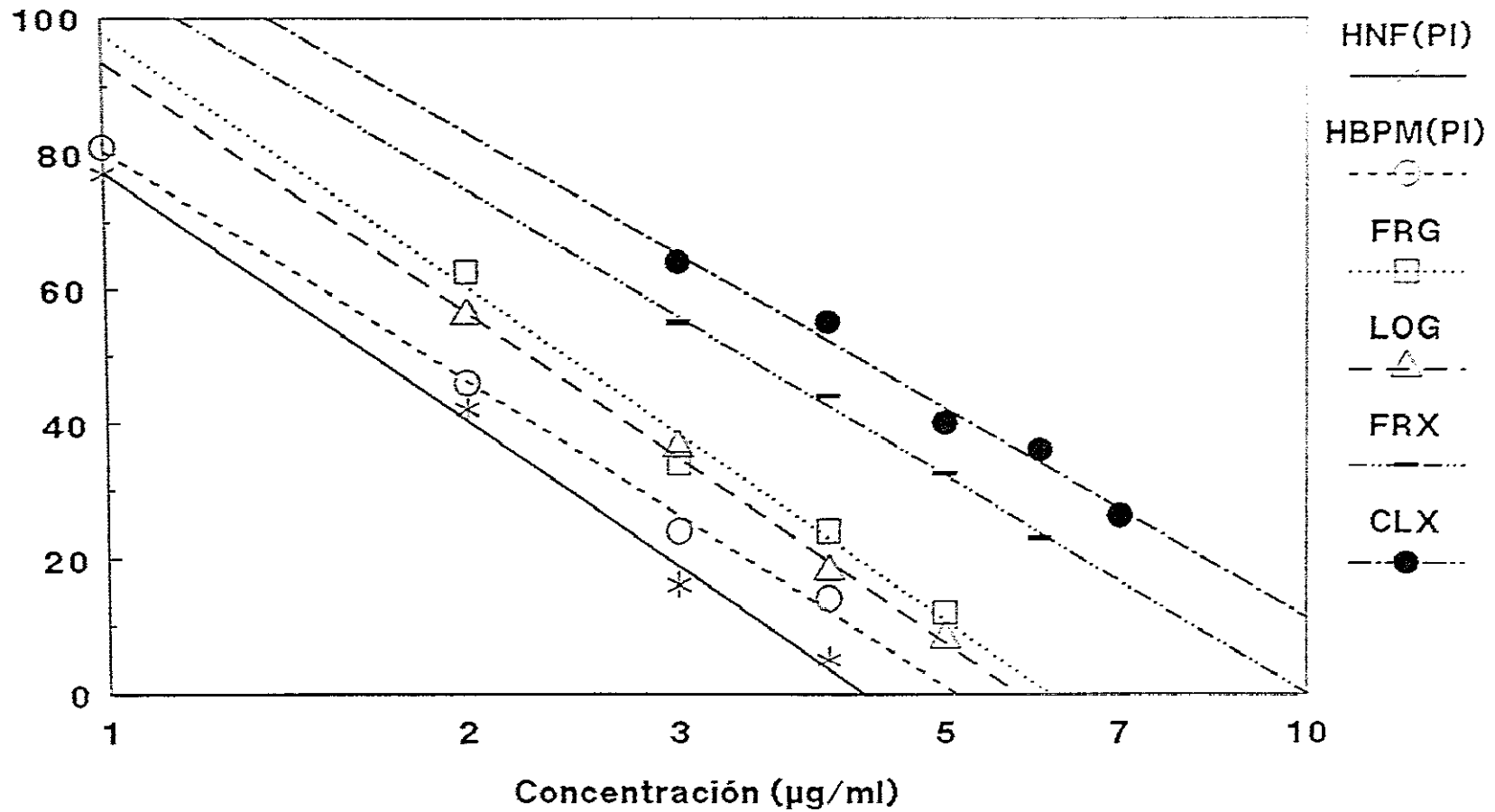


Figura 28

La condición de paralelismo entre las rectas dosis-respuesta presentadas en el gráfico de la fig. 28 indicaba un mecanismo de acción semejante para todas las preparaciones. Esta condición de paralelismo se demostró en un análisis de varianza ( $p > 0.05$ ), calculándose la potencia de cada una de las HBPM comerciales frente a los patrones internacionales de HNF y HBPM. Estos datos se presentan en la tabla 33. Frente al HNF(PI), LOG demostró ser el material más potente seguido de FRG, FRX y CLX. No se encontraron cambios importantes cuando los mismos materiales se compararon frente al patrón internacional de HBPM.

#### POTENCIAS RELATIVAS DE LAS HBPM EN EL ENSAYO DE GENERACIÓN DE TROMBINA

	Frente a HNF(PI)		Frente a HBPM(PI)	
	PPP	PRP	PPP	PRP
HNF (PI)	100	100	-	-
HBPM (PI)	48.2	89.9	100	100
FRAGMIN	36.6	72.5	76.7	81.0
LOGIPARIN	36.6	75.2	76.6	84.0
FRAXIPARINA	22.0	47.6	45.5	53.1
CLEXANE	18.8	39.8	38.6	44.2

Tabla 33. Potencias inhibitorias de generación de trombina de las HBPM comerciales, calculadas en términos de porcentaje frente al HNF(PI) y al HBPM(PI), en base al área de la curva de trombina en el sistema de PRP. Se incluyen asimismo, para su comparación, los valores correspondientes a los ensayos de generación de trombina en PPP.

#### IV.5.6 Comparación con el sistema de PPP en ausencia de F4P

Una concentración de trombina más baja que en el caso de PPP se obtuvo para el plasma control en el sistema de PRP, siendo el valor medio de aproximadamente 40 UI/ml. En el caso de PPP (sec. IV.2) el pico de trombina

variaba entre 50 y 70 UI/ml, en ausencia de heparina, dependiendo de los distintos lotes de plasma utilizados. Por otro lado, la concentración máxima de trombina aparecía en PPP alrededor de 105 a 135 segundos mientras que en PRP esta fase, como se ha indicado ya, era más larga. Un ejemplo de estas diferencias puede observarse en las curvas de generación de trombina en PPP y PRP que se recogen en la fig. 29.

Como se muestra en la misma figura, 1  $\mu\text{g/ml}$  de HNF apenas producía ningún efecto en PRP. Sin embargo, esa cantidad reducía la generación de trombina del plasma control en un 80% en PPP, además de producir un retraso significativo en la aparición del pico de trombina. Así, para alcanzar un 50% de inhibición de trombina en PRP se requería una concentración de HNF cinco veces superior a la necesaria en PPP (tabla 32).

Para las HBPM analizadas se encontraron también valores de CE50 más elevados en el sistema de PRP que en PPP (de 2.5 a 3.1 veces), pero las diferencias fueron más pequeñas que las observadas para HNF. Así, 2  $\mu\text{g}$  de HBPM, actividad inhibitoria equivalente a 1  $\mu\text{g}$  de HNF (80%) cuando ambas preparaciones se valoraron en PPP, produjeron aproximadamente un 50% de inhibición (tabla 30) al ser analizadas en un medio de PRP. Una situación similar se observó para las HBPM comerciales cuando se compararon a la misma actividad biológica que la indicada. Por consiguiente, cuando las potencias de las HBPM se calcularon como porcentaje de la actividad del HNF (PI), estimada como 100%, mostraron potencias más elevadas en PRP que en PPP (tabla 33), siendo de forma casi constante el doble.

Cuando se analizan los valores CE50 ( $\mu\text{g/ml}$  plasma) observados en los sistemas PRP y PPP, la relación es diferente a la obtenida cuando se comparan los valores de potencia. Las unidades CE50 son una indicación de la cantidad

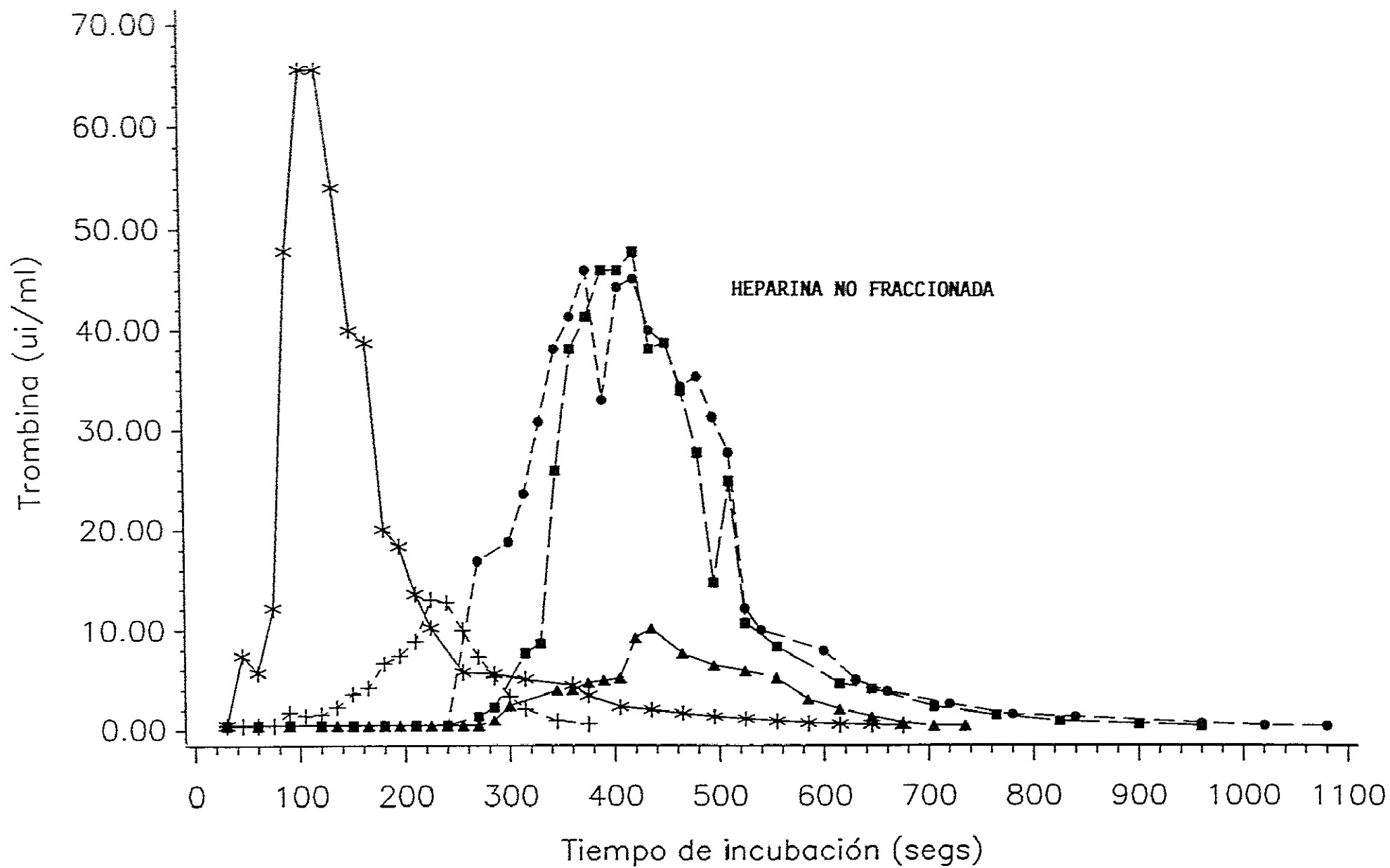


Figura 29



de HBPM necesaria para inhibir una misma actividad de trombina. Para alcanzar este efecto se necesitaron concentraciones de las HBPM que fueron en PRP 2.5 a 3.6 veces las concentraciones requeridas en PPP. Es decir, que aunque las HBPM fueron menos afectadas que HNF por la presencia de plaquetas, existía todavía un impacto significativo sobre las concentraciones requeridas para su actividad anticoagulante.

#### IV.5.7 Comparación con el sistema de PPP en presencia de F4P

Distintos experimentos de generación de trombina se realizaron previamente adicionando varias concentraciones de F4P(R) a PPP (sec. IV.4). En aquellos experimentos en los que se utilizaron 14  $\mu\text{g}$  de F4P(R), cantidad necesaria para neutralizar toda la actividad anti-Ila de 1  $\mu\text{g}$  de HNF(PI), se redujo la actividad inhibitoria de generación de trombina de la HNF desde el 80% a alrededor de un 20%. Este nivel de neutralización es como puede observarse en la tabla 34, similar al encontrado cuando se estudió la acción de 1  $\mu\text{g}$  de HNF sobre PRP (78%).

#### GENERACIÓN DE TROMBINA: PRP Y PPP + F4P(R)

Heparina $\mu\text{g/ml}$	PRP %	PPP + F4P(R) %
HNF(PI) 1 $\mu\text{g}$	78	82
HBPM(PI) 2 $\mu\text{g}$	46	57
FRAGMIN 3 $\mu\text{g}$	34	54
LOGIPARIN 3 $\mu\text{g}$	37	44
FRAXIPARINA 4 $\mu\text{g}$	44	65
CLEXANE 5 $\mu\text{g}$	40	51

Tabla 34. Porcentaje de trombina generada en PRP, con relación al plasma control (100%), en presencia de las concentraciones de heparina que producían la misma actividad biológica en PPP. Se incluyen asimismo los resultados obtenidos en el sistema de PPP tras añadir 14  $\mu\text{g}$  de F4P(R).

La misma concentración de F4P(R) tenía un efecto menor sobre actividades biológicas similares de las HBPM en el sistema PPP, encontrándose un rango de generación de trombina residual de 34 a 46%. La tabla 34 muestra una comparación de la generación de trombina obtenida en los sistemas de PRP y PPP más F4P(R). Esta comparación informa para ambos casos valores más altos de inhibición de generación de trombina por cada HBPM que por el HNF(PI), pero hay también una tendencia del porcentaje de inhibición a ser más elevado en PRP que en PPP más F4P. Parecen existir mayores diferencias cuando los ensayos se realizaron en PPP añadiendo una concentración fija (14 $\mu$ g) de F4P(R), pero estas podrían ser posiblemente explicadas por las variaciones intrínsecas de los ensayos.

#### **IV.5.6 Correlación de las Potencias Inhibitorias de Generación de Trombina en PRP y PPP y con las Actividades Anti-Xa y Anti-IIa.**

La tabla siguiente (tabla 35) muestra una comparación de las potencias relativas de las HBPM comerciales en los sistemas de PPP y PRP, con las actividades específicas encontradas en ensayos amidolíticos anti-Xa y anti-IIa, calculadas frente a HNF (PI).

En la sec. IV.2 (pág. 119) se demostró una alta correlación ( $r=0.994$ ,  $p<0.001$ ) entre la inhibición de generación de trombina en PPP y la actividad anti-IIa. No se obtenía sin embargo tan buena correlación entre el mismo sistema y la actividad anti-Xa de aquellas preparaciones. En el sistema de PRP la correlación con las actividades anti-IIa es de orden inferior,  $r=0.80$  ( $p=0.056$ ), pero sorprendentemente aparece también una correlación del mismo orden entre los resultados de inhibición de generación de trombina en PRP y los resultados de actividad anti-Xa, siendo el valor de  $r=0.784$  ( $p=0.065$ ).

**POTENCIAS RELATIVAS DE LAS HBPM EN ENSAYOS DE GENERACIÓN DE TROMBINA (PRP Y PPP) Y AMIDOLÍTICOS (ANTI-Xa Y ANTI-IIa)**

<b>FRENTE A HNF (PI)</b>				
	<b>PPP</b>	<b>PRP</b>	<b>ANTI-Xa</b>	<b>ANTI-IIa</b>
<b>HNF(PI)</b>	100	100	100	100
<b>HBPM(PI)</b>	48.2	89.9	87.0	34.7
<b>FRAGMIN</b>	36.6	72.5	67.4	30.0
<b>LOGIPARIN</b>	36.6	75.2	40.9	27.5
<b>FRAXIPARINA</b>	22.0	47.6	49.2	14.0
<b>CLEXANE</b>	18.8	39.8	50.8	12.9

Tabla 35. Comparación de las potencias relativas de las HBPM en los ensayos de anti-Xa, anti-IIa y de generación de trombina. Las actividades específicas anti-Xa y anti-IIa de las HBPM se expresan en porcentaje de los valores de actividad específica del HNF(PI), en las dos columnas de la derecha. Las potencias calculados en base a los resultados del área bajo la curva de trombina en los sistemas de PPP y PRP, se incluyen en las dos columnas a la izquierda.

#### IV.5.7 Discusión

Se ha sugerido que la diferencia entre la acción de las heparinas en PRP y en PPP puede explicarse por la liberación del material neutralizante de heparina en PRP, con toda probabilidad F4P, a partir de las plaquetas activadas y que este material bloquearía preferentemente el efecto de HNF. Los experimentos recogidos en esta sección, que presentan por primera vez datos comparativos de HNF y de las HBPM comerciales en un sistema de generación de trombina en PRP, soportan esta hipótesis: demuestran que HNF, a la misma actividad biológica que las HBPM en PPP, era capaz de producir una inhibición de generación de trombina más baja que aquéllas en PRP. Por otro lado, cuando las potencias de las HBPM analizadas en PRP, frente al HNF(PI), se compararon con los datos obtenidos en PPP, los valores relativos fueron de forma constante el doble de los encontrados en éste último sistema. Esto

significa que todas las HBPM fueron neutralizadas en una proporción similar por F4P.

A diferencia de la situación en el sistema de PPP, los coeficientes de correlación de la inhibición de generación de trombina con las actividades anti-Xa y anti-IIa fueron los mismos para ambas actividades. Esto podría explicarse porque en PRP los oligosacáridos de menor peso molecular, que tienen únicamente actividad anti-Xa, son más resistentes a la neutralización por F4P, y por consiguiente llegan a ser más influyentes en PRP que en PPP, tal como fue sugerido por Hemker y Béguin (1992).

Es posible que aparte de estas observaciones, las principales diferencias entre HNF y las HBPM se encuentren en sus propiedades farmacológicas. Estudios de las actividades antitrombóticas de las 4 HBPM comerciales investigadas, en un modelo de estasis venosa, se presentan en la sección siguiente.

## IV.6 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE HNF Y HBPM COMERCIALES

Los estudios mostrados hasta aquí en esta memoria soportan la hipótesis de que la actividad anti-IIa de las HBPM, más que su actividad anti-Xa, sería responsable de la inhibición de generación de trombina *in vitro*. El objetivo de los experimentos que se describirán en esta sección, ha sido investigar la relevancia de estos resultados para determinar el potencial antitrombótico de las HBPM comerciales, comparadas con HNF, utilizando un modelo animal de trombosis venosa. Los resultados se han correlacionado con la capacidad de cada material estudiado para interrumpir la generación de trombina en PPP y PRP y con sus actividades anti-Xa y anti-IIa medidas por sustratos cromogénicos.

### IV.6.1 Curvas dosis-respuesta de HNF y de HBPM Comerciales

Para relacionar la prevención del trombo con las distintas dosis de cada material estudiado se utilizó un modelo Wessler de estasis modificado (ver métodos p. 82). Un total de 130 conejos blancos Nueva Zelanda se utilizaron a lo largo de la investigación. Suero humano activado por caolín se utilizó como estímulo trombogénico.

Como dosis de referencia para investigar la acción antitrombótica en el conejo se escogieron los valores "CE50" encontrados, para HNF y las HBPM, en los ensayos *in vitro* de generación de trombina, en PPP y PRP. Se utilizaron además otras dosis, más bajas o más altas que la equivalente a la "CE50" en PRP (tabla 36), a fin de establecer una curva dosis-respuesta para cada uno de los materiales utilizados, a 10 y 20 min. de estasis. Las dosis "CE50 PPP" y "CE50 PRP" para administración en el conejo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso) se calcularon multiplicando los valores obtenidos en los ensayos de generación de trombina

( $\mu\text{g/ml}$  plasma) por el volumen de plasma por Kg de peso de conejo (40 ml/Kg). De la misma forma se calcularon las "dosis media y alta", a partir de concentraciones escogidas de los ensayos de generación de trombina en función de los resultados observados con los valores "CE50".

### DOSIS DE HNF Y DE LAS HBPM ADMINISTRADAS EN EL MODELO DE TROMBOSIS VENOSA EN EL CONEJO

	"CE50 PPP"	Dosis Media	"CE50 PRP"	Dosis Alta
HNF (4°PI)	20	40,45,50	60	-
FRAGMIN	30	50	80	120,200
LOGIPARINA	35	50	80	120,180,240
FRAXIPARINA	55	-	160	240,300,380
CLEXANE	60	-	200	300,400,500

Tabla 36. Las dosis se expresan en  $\mu\text{g/kg}$  de peso de conejo. El término "dosis media" se consideró para dosis entre los valores correspondientes a las "CE50" en PPP y PRP. Cualquier dosis más alta que los valores "CE50" en PRP fue denominada "dosis alta".

La primera dosis administrada de las HBPM, dosis "CE50 PPP" extrapolada al volumen de plasma en el conejo, dió para todas las preparaciones un 0% de prevención de trombosis a 10 min. de estasis (tabla 37), lo que significa que en todos los animales se obtuvieron coágulos completos. Este no fue el caso sin embargo para HNF, que a 20  $\mu\text{g/kg}$  de peso de conejo produjo un 40% de prevención a 10 min. y un 20% de prevención a 20 min. de estasis.

La segunda dosis ensayada fue la concentración equivalente a los valores "CE50 PRP" en el conejo, que indujo la prevención de trombosis mostrada en la tabla 37 para HNF y las HBPM comerciales. Los datos de esta tabla muestran que las curvas dosis-respuesta para HNF, a 10 y 20 min. de estasis, se encuentran entre las dosis correspondientes a "CE50 PPP" y "CE50

PRP". Para las HBPM se observó un efecto mucho menor que para HNF a 10 min., decreciendo de Fragmin a Clexane. Después de 20 min. de estasis ninguna de las HBPM estudiadas, excepto Fragmin, fue capaz de producir prevención de trombosis .

### PREVENCIÓN DE TROMBOSIS

DOSIS $\mu\text{g}/\text{kg}$	HNF		FRG		LOG		FRX		CLX	
	10'	20'	10'	20'	10'	20'	10'	20'	10'	20'
CE50 PPP	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0
CE50 PRP	95	90	70	20	40	0	35	0	25	0

Tabla 37. Prevención de trombosis (%) en el conejo, a 10 y 20 min. de estasis, obtenida al administrar dosis de HNF y HBPM, equivalentes a los valores "CE50 PPP" Y "CE50 PRP".

Los efectos diferentes de los cinco agentes antitrombóticos investigados, a las distintas dosis estudiadas, pueden ser analizados en detalle en las tablas 38 y 39. Los datos brutos sugieren que FRG y LOG fueron más eficaces que FRX y CLX, en términos de peso, en el modelo animal estudiado: mientras que 120  $\mu\text{g}$  de FRG y LOG producían alrededor de 90% de prevención de trombosis a 10 min. de estasis, se necesitaron 300 y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso de conejo de FRX y CLX respectivamente, para alcanzar una prevención similar. La misma estimación puede hacerse a partir de las curvas de dosis-respuesta antitrombótica que se muestran en las fig. 30 y 31, obtenidas con los datos de las tablas 38 y 39.

En resumen, la inhibición de generación de trombina *in vitro* a alrededor del 50 % de los valores control en PPP, fue insuficiente para inhibir trombosis tras 10 min. de estasis en todos los materiales estudiados excepto para HNF.

RESPUESTA ANTITROMBÓTICA EN EL CONEJO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE HNF Y HBPM COMERCIALES (10 min. estasis)

Dosis ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Trombos valorados Nº de Conejos					Media Trombos	Prevención Trombosis %
	0	1	2	3	4		
<b>A. HNF (4º PI)</b>							
20 (5)	1	-	2	-	2	2.4	40
40 (5)	-	4	-	1	-	1.4	65
45 (5)	3	2	-	-	-	0.4	90
50 (5)	1	4	-	-	-	0.8	80
60 (5)	4	1	-	-	-	0.2	95
<b>B. Fragmin</b>							
50 (5)	-	3	-	-	2	2.2	45
80 (5)	3	-	1	-	1	1.2	70
120 (5)	3	1	1	-	-	0.6	85
200 (5)	4	1	-	-	-	0.2	95
<b>C. Logiparin</b>							
50 (5)	-	-	-	2	3	3.6	10
80 (5)	1	1	-	1	2	2.4	40
120 (5)	4	-	1	-	-	0.4	90
180 (5)	5	-	-	-	-	0	100
<b>D. Fraxiparina(*)</b>							
160 (5)	-	1	1	2	1	2.6	35
240 (5)	2	1	1	-	1	1.4	65
300 (5)	2	2	-	-	-	0.5	87
380 (5)	5	-	-	-	-	0	100
<b>E. Clexane</b>							
200 (5)	-	1	1	-	3	3.0	25
300 (5)	2	-	1	1	1	1.8	55
400 (5)	4	1	-	-	-	0.2	95
500 (5)	4	1	-	-	-	0.2	95

Tabla 38. Resultados encontrados en el segmento venoso ipsilateral, abierto tras 10 min. de estasis. La cifra entre paréntesis (5) indica el número de conejos observados para cada dosis. 0 a 4 representan los valores de la escala en la que se analizó el efecto de trombosis. Las dosis que no causaron prevención de trombosis no se incluyeron en la curva dosis-respuesta. (\*) En la dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se perdió la lectura de un segmento a 10 min.



RESPUESTA ANTITROMBÓTICA EN EL CONEJO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE HNF Y HBPM COMERCIALES (20 min. estasis)

Dosis ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Trombos valorados N° de Conejos					Media Trombos	Prevención Trombosis %
	0	1	2	3	4		
<b>A. HNF (4° PI)</b>							
20 (5)	-	-	2	-	3	3.2	20
40 (5)	-	-	-	-	5	4.0	0
45 (5)	-	1	2	1	1	2.4	40
50 (5)	2	1	-	-	2	1.8	55
60 (5)	2	3	-	-	-	0.6	90
<b>B. Fragmin</b>							
50 (5)	-	-	-	1	4	3.8	5
80 (5)	-	1	-	1	3	3.2	20
120 (5)	-	2	-	-	3	2.8	30
200 (5)	2	1	1	-	1	1.4	65
<b>C. Logiparin (*)</b>							
50 (5)	-	-	-	-	5	4.0	0
80 (5)	-	-	-	-	5	4.0	0
120 (5)	1	-	1	-	3	2.8	30
180 (5)	1	4	-	-	-	0.8	80
240 (5)	2	2	-	-	-	0.5	87
<b>D. Fraxiparina</b>							
160 (5)	-	-	-	-	5	4.0	0
240 (5)	-	-	1	-	4	3.6	10
300 (5)	-	-	3	1	1	2.6	35
380 (5)	2	2	-	1	-	1.0	75
<b>E. Clethane</b>							
200 (5)	-	-	-	-	5	4.0	0
300 (5)	-	-	-	1	4	3.8	5
400 (5)	2	1	-	1	1	1.6	60
500 (5)	1	3	-	1	-	1.2	70

Tabla 39. Resultados encontrados en el segmento venoso contralateral, abierto tras 20 min. de estasis. La cifra entre paréntesis (5) indica el número de conejos observados para cada dosis. 0 a 4 representan los valores de la escala en la que se analizó el efecto de trombosis. Las dosis que no causaron prevención de trombosis, no se incluyeron en la curva dosis-respuesta. (\*) En la dosis de 240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se perdió la lectura de un segmento a 20 min.

EFFECTO ANTITROMBÓTICO  
10 min. estasis

Prevención de Trombosis (%)

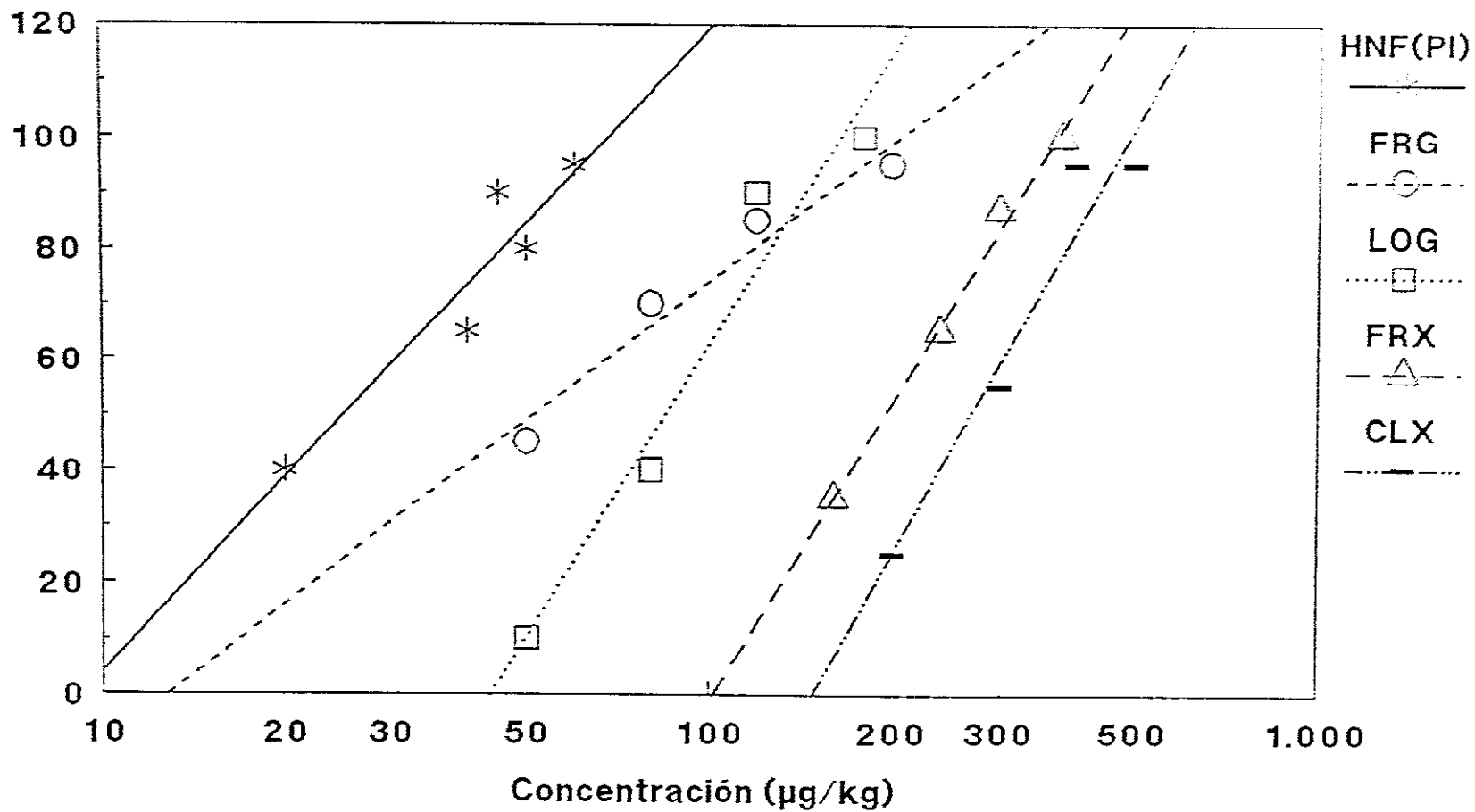


Figura 30

EFFECTO ANTITROMBÓTICO  
20 min. estasis

Prevención de Trombosis (%)

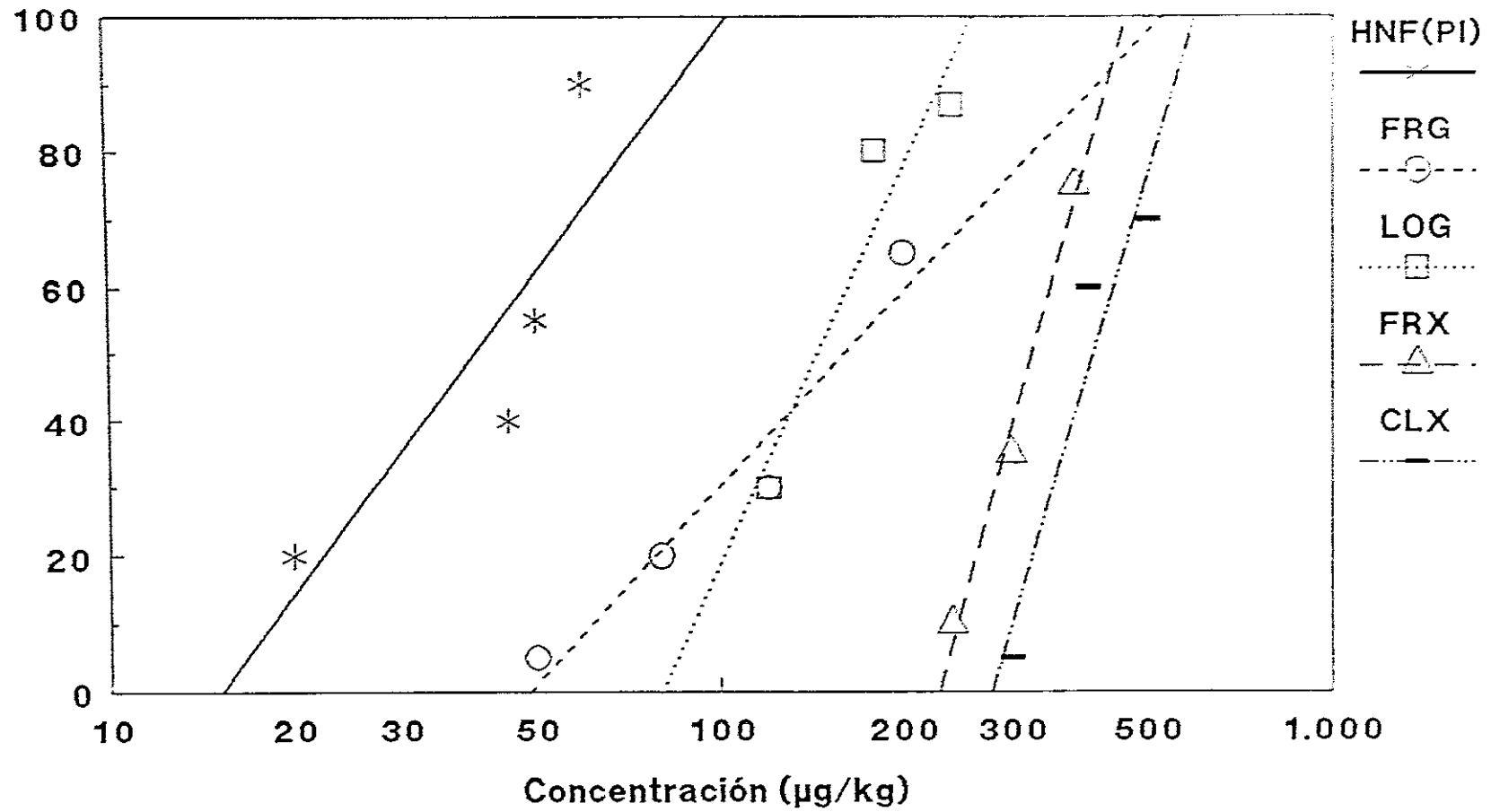


Figura 31

Las dosis correspondientes a los valores "CE50" de generación de trombina en PRP fueron suficientes para reducir trombosis en diferentes proporciones tras 10 min. de estasis, pero no después de 20 min., con la excepción de nuevo de HNF que prevenía trombosis completamente a esa dosis.

En cuanto a las proporciones relativas de HNF y de las HBPM necesarias para obtener un efecto antitrombótico, puede observarse que una dosis de HNF de 60  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso de conejo inhibía completamente trombosis después de 10 y 20 min. de estasis. Por el contrario, todas las HBPM investigadas fueron claramente menos efectivas que HNF, en términos de peso, no observándose a esa concentración ninguna inhibición de trombosis a 20 min. de estasis y solo alguna prevención de trombosis a 10 min. en el caso de FRG y LOG. No obstante, si las dosis de las distintas HBPM que produjeron máxima prevención de trombosis a 10 min. de estasis, se expresan en UI de actividad anti-IIa, se observa que todas las preparaciones se mueven en un mismo y estrecho rango de actividad (tabla 40). Este hecho no ocurre cuando las mismas dosis se expresan en actividad anti-Xa, en cuyo caso esta actividad varía mucho más ampliamente.

**DOSIS DE HNF Y HBPM COMERCIALES QUE PRODUJERON MÁXIMA PREVENCIÓN DE TROMBOSIS: ACTIVIDADES ANTI-Xa Y ANTI-IIa**

	( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	aXa (UI/kg)	IIa (UI/kg)
HNF(4 <sup>PI</sup> )	60	11.6	11.6
FRAGMIN	200	26.0	11.6
LOGIPARIN	180	14.2	9.5
FRAXIPARINA	380	36.1	10.3
CLEXANE	400	39.2	10.0

Tabla 40. Dosis de HNF y HBPM administradas en el conejo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) que produjeron prevención completa de trombosis a 10 min. de estasis, expresadas en actividad anti-Xa y anti-IIa para cada una de las preparaciones.

#### IV.6.2 Potencia Antitrombótica de las HBPM Comerciales

Diferencias significativas se manifestaron a primera vista para cada agente antitrombótico, entre 10 y 20 min. de estasis: 120  $\mu\text{g}$  de FRG y LOG mostraban 90% de prevención a 10 min. mientras que solo un 30 % de prevención se producía con la misma dosis a 20 min. Diferencias similares fueron verdad para FRX y CLX. A pesar de estas observaciones, cuando se realizó un análisis de líneas paralelas, con los datos de las tablas 38 y 39, para determinar las diferentes potencias antitrombóticas de las HBPM comerciales, por comparación de sus curvas dosis-respuesta con la curva dosis-respuesta de HNF, tomando la actividad de ésta como 100%, los resultados se encontraron en el mismo orden ya fuera a 10 ó 20 min. de estasis (tabla 41).

#### POTENCIAS ANTITROMBÓTICAS DE LAS HBPM COMERCIALES.

10' ESTASIS		
Material	Potencia	Intervalo de confianza
HNF (4° PI)	100	-
FRAGMIN	41.5	31.5 - 54.8
LOGIPARIN	33.3	24.8 - 43.7
FRAXIPARINA	15.1	11.4 - 20.0
CLEXANE	11.0	8.3 - 14.4
20' ESTASIS		
Material	Potencia	Intervalo de confianza
HNF (4° PI)	100	-
FRAGMIN	29.2	19.4 - 40.7
LOGIPARINA	30.6	21.1 - 46.6
FRAXIPARINA	11.3	7.6 - 16.3
CLEXANE	9.5	6.4 - 13.8

Tabla 41. Valores de potencia de las HBPM, expresados en porcentaje frente a HNF, obtenidos por análisis de líneas paralelas a partir de las curvas dosis-respuesta de prevención de trombosis mostradas en las tablas 38 y 39 y figs. 30 y 31. Se calculó el intervalo de confianza con fiabilidad de 95%.

Las figuras 30 y 31 muestran evidencia del paralelismo, frente al patrón internacional de HNF, de todas las curvas dosis-respuesta obtenidas para los diferentes materiales, a 10 y 20 min. de estasis ( $p > 0.05$ ). Procede señalar asimismo la coincidencia del valor de la pendiente común de las curvas dosis-respuesta obtenidas a 10 y 20 min. de estasis ( $b = 0.014$ ), indicando que las curvas dosis-respuesta observadas a 10 y 20 min. son paralelas entre sí, para HNF y para cada una de las HBPM estudiadas, expresando un comportamiento similar de cada uno de los materiales para ambos periodos de observación.

La dosis media efectiva en el conejo (DE50) se estimó también a partir de los gráficos mostrados en las fig. 30 y 31. Tal como se muestra en la tabla 42, para alcanzar 50% de prevención de trombosis a 20 min. de estasis se necesitó, con la excepción de FRG, una cantidad de heparina próxima al doble de la cantidad que producía la misma prevención a 10 min. Un mayor período de estasis representaba por consiguiente un mayor desafío trombogénico y requería la supresión de generación de trombina en mayor extensión, necesitando consecuentemente mayores cantidades de HNF y de las HBPM para su inhibición. Esto explicaría el encuentro de potencias similares para los dos distintos períodos de observación.

DE50 ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )

	10'	20'	20'/10'
HNF (4° PI)	26.3	39.8	1.5
FRAGMIN	52.8	155.1	2.9
LOGIPARIN	85.0	146.4	1.7
FRAXIPARINA	194.3	323.0	1.7
CLEXANE	271.7	405.4	1.5

Tabla 42. Dosis de HNF y HBPM ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso de conejo) que produjeron un 50% de prevención de trombosis, a 10 y 20 min. de estasis.

#### IV.6.3 Correlación con la Actividad Inhibitoria de Generación de Trombina

Para valorar la relación entre inhibición de la formación del trombo en el modelo animal e inhibición de generación de trombina en PPP y PRP, se compararon las potencias relativas de las HBPM frente a HNF, en los tres sistemas de ensayo (tabla 43).

POTENCIAS RELATIVAS DE HBPM COMERCIALES FRENTE A HNF

Inhibición de Generación Trombina	Prevenición de Trombosis	
	PPP	PRP
HNF (4° PI)	100	100
FRAGMIN	37	73
LOGIPARIN	37	75
FRAXIPARINA	22	48
CLEXANE	19	40

Tabla 43. Los datos se expresan en porcentaje frente a la actividad de HNF, estimada como 100%.

Se encontró una excelente correlación entre inhibición de generación de trombina en PPP y el grado de inhibición de la formación del trombo tras 10 min. y 20 min. de estasis, con valores de  $r=0.981$  ( $p=0.019$ ) y  $r=0.987$  ( $p=0.013$ ) respectivamente. Buena correlación se encontró asimismo cuando se estimaron las potencias relativas de las HBPM en PRP, con valores de  $r=0.960$  ( $p=0.04$ ) y  $0.991$  ( $r=0.009$ ) para 10 y 20 min. de estasis. Como puede observarse en la tabla 43, las potencias relativas de las HBPM en PRP, fueron aproximadamente dos veces las correspondientes obtenidas en PPP. Esta diferencia se explicó en el capítulo anterior a causa de la menor neutralización de las HBPM por F4P, en comparación con HNF.

Por consiguiente, el grado de inhibición de la generación de trombina *in*

*in vitro* demostró ser un buen índice del potencial antitrombótico en estos experimentos. Basados en estos resultados, la capacidad de inhibir la generación de trombina proveería un índice fiable *in vitro* para estimar posibles efectos antitrombóticos de glicosaminoglicanos.

#### IV.6.4 Correlación con las Actividades Anticoagulantes Anti-Xa y Anti-IIa

Se investigó también la relación entre acción antitrombótica y actividades anticoagulantes obtenidas en los ensayos anti-Xa y anti-IIa por sustratos cromogénicos. De nuevo, las actividades anti-IIa *in vitro* correlacionaron muy bien con las actividades antitrombóticas de las HBPM a 10 min.,  $r=0.992$  ( $p=0.008$ ), y 20 min. de estasis,  $r=0.982$  ( $p=0.018$ ). Es interesante observar que cuando las dosis de HNF y de las HBPM administradas en el modelo de trombosis venosa en el conejo, se expresaron en actividad anti-IIa (tabla 44), ocurría que estas actividades eran similares para las 4 HBPM estudiadas. Debe recordarse asimismo que 11.6 UI anti-IIa, equivalentes a 60  $\mu\text{g}$  de HNF, inhibían trombosis completamente, y lo mismo ocurría con los otros materiales cuando una similar actividad anti-IIa fue inyectada.

#### ACTIVIDADES ANTI-IIa DE HNF Y HBPM COMERCIALES ADMINISTRADAS EN EL MODELO DE TROMBOSIS VENOSA EN EL CONEJO

	ACTIVIDAD ANTI-IIa			
	CE50 PPP	Dosis Media	CE50 PRP	Dosis Alta
HNF (4° PI)	3.9	7.7,8.7,9.6	11.6	-
FRAGMIN	1.7	2.9	4.6	7.0,11.6
LOGIPARIN	1.8	2.6	4.2	6.4,9.5,12.7
FRAXIPARINA	1.5	-	4.3	6.5,8.1,10.3
CLEXANE	1.5	-	5.0	7.5,10.0,12.5

Tabla 44. Actividades anti-IIa correspondientes a las dosis administradas en el conejo (ver tabla 36), expresadas en UI/kg de peso de conejo.



En contraste se encontró una falta de correlación entre actividad anti-Xa e inhibición de trombosis, siendo los coeficientes de correlación de  $r=0.425$  ( $p=0.575$ ) y  $r=0.143$  ( $p=0.857$ ), para 10 y 20 min. de estasis. Las actividades anti-Xa correspondientes a las dosis de HNF y de las HBPM administradas en el conejo, no mostraron ninguna relación aparente en cuanto a su efecto antitrombótico.

#### IV.6.5 Actividades Biológicas en el Conejo

Las actividades biológicas en el plasma del conejo, correspondientes a los valores DE50 obtenidos a partir de los gráficos de las figuras 30 y 31, se calcularon en unidades internacionales anti-Xa y anti-IIa por ml de plasma de conejo y en porcentaje de trombina que sería generada en los sistemas PPP y PRP (tabla 45). Estos parámetros podían dar alguna información relevante acerca de qué se necesita en la sangre del conejo para prevenir trombosis. Para las dos diferentes situaciones analizadas, 10 y 20 min. de estasis, las actividades anti-IIa y el porcentaje de trombina generado en PPP fueron bastante similares para todos los materiales investigados, incluida HNF. Las actividades anti-Xa, sin embargo, cubrían un amplio rango de dispersión.

Alguna crítica puede hacerse sobre la interpretación de los valores DE50, en los gráficos de generación de trombina obtenidos en PPP y PRP, para encontrar el correspondiente porcentaje de trombina generada en el plasma de conejo, a la particular concentración de los diferentes materiales estudiados. Sin embargo, aunque las actividades relativas pueden ser diferentes en plasma de conejo y en plasma humano, ésta era la mejor aproximación y la única posible con los datos disponibles en esta fase de la investigación. Para una más precisa valoración, han de estudiarse las actividades anticoagulantes en muestras *ex-vivo*, tomadas a diferentes intervalos en el conejo.

## ACTIVIDADES DE HNF (4°PI) Y DE HBPM COMERCIALES EN EL CONEJO

a) 10' ESTASIS						
	DE50		Anti-Xa	Anti-IIa	% Inhibición de Generación de Trombina	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	UI/ml	UI/ml	PPP	PRP
HNF (4° PI)	26.3	0.66	0.13	0.13	73.0	0.7
FRAGMIN	52.8	1.32	0.17	0.08	66.2	17.3
LOGIPARIN	85.0	2.12	0.17	0.11	76.5	46.6
FRAXIPARINA	194.3	4.86	0.46	0.13	82.4	66.6
CLEXANE	271.7	6.79	0.67	0.17	83.6	71.3
b) 20' ESTASIS						
	DE50		Anti-Xa	Anti-IIa	% Inhibición de Generación de Trombina	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	UI/ml	UI/ml	PPP	PRP
HNF (4° PI)	39.8	1.0	0.19	0.19	81.2	22.2
FRAGMIN	155.1	3.9	0.50	0.22	86.2	75.4
LOGIPARIN	146.4	3.7	0.29	0.19	85.4	75.8
FRAXIPARINA	323.0	8.1	0.77	0.22	88.3	90.2
CLEXANE	405.4	10.1	0.99	0.25	87.9	89.2

Tabla 45. Correspondencia de los valores DE50 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso de conejo) en el plasma del conejo, expresados en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; en UI de actividad anti-Xa y anti-IIa y como porcentaje de inhibición de la trombina generada en presencia de las dosis referidas.

### IV.6.6 Discusión

En el modelo animal utilizado, la actividad antitrombótica de las heparinas estudiadas fue dependiente de la dosis y se alcanzó la prevención completa de trombosis con la misma actividad anti-IIa para todos los materiales estudiados, incluida HNF.

A la luz de los datos mostrados, las actividades anti-Xa *in vitro* no eran un buen pronóstico de la acción antitrombótica de las HBPM. Sin embargo, las

actividades anti-IIa así como de inhibición de generación de trombina *in vitro*, correlacionaban bien con el efecto antitrombótico de las HBPM investigadas, al menos en el modelo animal estudiado.

A causa de que el F4P neutraliza las HBPM en menor proporción que la HNF, se ha sugerido que sus actividades relativas podían ser bastante diferentes en una situación donde hubiera una extensa actividad de plaquetas. Aunque se encontró una relación de factor 2 para las potencias relativas PRP/PPP de las HBPM estudiadas, no pudo probarse influencia de la activación de plaquetas y liberación de F4P sobre su acción antitrombótica, en estos experimentos. Cuando se comparaban frente a HNF, la inhibición de generación de trombina por las HBPM en PPP, mas bien que PRP (tabla 43), mostraba la más estrecha relación con las actividades antitrombóticas *in vivo*. El hecho de que las dosis "CE50 en PPP" no fueran efectivas y las dosis "CE50 en PRP" fueran más eficaces, podía indicar alguna implicación de las plaquetas pero los datos recogidos en la misma tabla muestran que este papel es probablemente no relevante *in vivo* y no pueden explicar el éxito terapéutico de las HBPM frente a HNF al menos en el modelo animal estudiado.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

## V. DISCUSIÓN GENERAL

Estudios recientes de los grupos de Ofosu et al. (1987, 1989) y Hemker et al. (Hemker, 1987; Béguin et al., 1988; Pieters y Lindhout, 1988), han puesto de manifiesto que la capacidad global de HNF y de HBPM para inhibir la generación de trombina en plasma es principalmente mediada por la inhibición de la trombina generada, en particular, via inhibición de los "feedback loops" de trombina; esto es, de la activación de los factores V y VIII. Se ha indicado también que algunas HBPM son inhibidores mucho menos efectivos de generación de trombina que HNF, a pesar de su relativamente alta actividad anti-Xa (Hemker, 1987).

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue valorar la capacidad de las HBPM, disponibles en clínica, para inhibir la generación de trombina en el sistema intrínseco, en comparación con HNF. Utilizando un sistema de ensayo diferente del de Béguin et al. (1988), encontramos esencialmente resultados similares, requiriéndose concentraciones de las HBPM más elevadas que de HNF para producir una actividad biológica equivalente. Sin embargo, existen considerables diferencias entre las distintas HBPM, con valores de CE50 que se mueven en un rango de 0.6 a 1.6  $\mu\text{g/ml}$ , en comparación con los 0.33  $\mu\text{g/ml}$  para HNF (tabla 11, sección IV.2). Estas diferencias pueden ser ampliamente explicadas por las existentes en la actividad anti-IIa de las HBPM (tabla 5, sección IV.1). La casi exacta correlación entre estas dos medidas, de inhibición de generación de trombina y de actividad anti-IIa (sec. IV.2, pág. 105) sugiere la importancia de la inhibición de trombina en la inhibición de la generación de trombina. No prueba, sin embargo, una relación causal ya que es posible que otras propiedades no medidas en este estudio, p.e. inhibición de factor IXa, puedan también estar involucradas en la inhibición de generación de trombina.

Considerando la predicción de la actividad antitrombótica *in vivo*, la inhibición de generación de trombina en PPP parece un índice pobre, ya que las HBPM son altamente efectivas en la profilaxis de TVP, en dosis mucho menores que las de HNF, y las dosis comparativas de los distintos productos (sec. I.8, tabla 2) no parecen correlacionar con sus CE50 en este sistema de ensayo. Existen dos posibles razones para ello. La primera y más importante sería la diferencia entre HNF y las HBPM, en cuanto a su farmacocinética. Así, la mejorada biodisponibilidad y mayor semivida biológica de las HBPM permite una dosificación y frecuencia más reducidas. La segunda posibilidad es que las plaquetas pudieran influenciar las actividades relativas de HNF y de las HBPM a causa de su diferente reactividad con F4P, según sugirió Hemker (1987), sobre la base de estudios de generación de trombina en presencia de plaquetas. Este hecho motivó otro de los objetivos del presente estudio.

Aunque se ha informado la interacción de oligosacáridos individuales con F4P (Lane et al., 1984, 1986), no se ha realizado un estudio comparativo de los efectos de F4P sobre las HBPM disponibles comercialmente, en un sistema de generación de trombina. Es por ello que en el presente trabajo se investigaron las capacidades de los materiales referidos para inhibir generación de trombina en PPP, en presencia de F4P. Inicialmente se escogió una concentración de F4P que inhibía toda la actividad anti-IIa de HNF. Sin embargo, a pesar del hecho de que todas las moléculas con actividad anti-IIa fueron neutralizadas, un 20% de actividad inhibitoria permanecía sin neutralizar en el ensayo de generación de trombina (fig. 19 y tabla 25, sec. IV.4). Esta dicotomía fue mucho más aparente en las HBPM, las cuales mostraron un menor grado de neutralización en el ensayo de generación de trombina que en los ensayos anti-IIa: para CLX y LOG la discrepancia en el porcentaje de neutralización fue más del doble (fig. 19; tabla 25, sec. IV.4).

Se examinó la posibilidad de que los diferentes grados de neutralización pudieran estar relacionados con diferencias en las condiciones de ensayo, habiéndose realizado los ensayos anti-IIa con ATIII purificada y en ausencia de calcio, mientras que la generación de trombina se midió en PPP al que se añadió  $\text{CaCl}_2$ . Para LOG, la sustitución de ATIII por plasma desfibrinado reducía el grado de neutralización de actividad anti-IIa, de 70% a 45%, valor éste más próximo al obtenido en el sistema de generación de trombina (34%). Sin embargo, la sustitución de ATIII por plasma, no producía diferencias en el grado de neutralización de la actividad anti-IIa de HNF y las otras HBPM por F4P. De igual manera, la adición de  $\text{CaCl}_2$  no tenía efecto sobre el grado de neutralización de la actividad anti-IIa de ninguna de las varias heparinas.

Por consiguiente, parece ser que una porción de la actividad inhibitoria de generación de trombina de las HBPM sería debida a su actividad anti-Xa, que es menos fácilmente neutralizada por el F4P. Datos similares sobre la actividad anti-Xa fueron demostrados por Holmer y Soderstrom (1983) y Harenberg et al. (1986) con protamina. Por otro lado, en el curso de nuestra investigación, Schoen et al. (1991) publicaron los resultados de sus estudios de neutralización sobre las actividades anti-IIa y anti-Xa de HNF, HBPM (PI) y dos HBPM comerciales. Encontraron que, mientras todas las actividades anti-IIa podían ser fácilmente neutralizadas, las actividades anti-Xa de las HBPM podían dividirse en tres grupos: uno neutralizado tan fácilmente como la actividad anti-IIa y que suponía aproximadamente el 50% del total; el segundo, alrededor del 35-50% del total, requería un exceso de F4P; y el tercero, que era totalmente resistente a la neutralización por F4P. Estos datos ayudan a explicar los resultados de neutralización por F4P presentados en esta memoria, en los diferentes sistemas de ensayo.

El hecho de que toda la actividad inhibitoria en el ensayo de generación

de trombina pueda ser neutralizada por una suficiente alta concentración de F4P, incluso permaneciendo una actividad anti-Xa sustancial, indica que el tercer grupo de actividad anti-Xa, que probablemente consiste de moléculas por debajo de 12 sacáridos (Lane et al., 1984), no produce contribución alguna en la inhibición de generación de trombina. Sin embargo, puesto que las moléculas en el primer grupo de actividad anti-Xa coinciden con aquéllas que tienen actividad anti-IIa y son fácilmente neutralizadas por F4P, los resultados que se presentan sugieren que las moléculas en el segundo grupo de actividad anti-Xa, que son más resistentes a F4P, presentan una contribución sustancial en la inhibición de generación de trombina por las HBPM. Estudios sobre oligosacáridos individuales, realizados por Lane et al. (1984), indican que estas moléculas podrían contener entre 12 y 18 sacáridos.

Otra razón para explicar el hecho de que la inhibición de generación de trombina sea menos neutralizada por F4P cuando se utilizan las HBPM que con HNF, es simplemente las más altas concentraciones de las HBPM que se requieren para alcanzar el mismo efecto (tabla 11, sección IV.2). Considerando también las mayores concentraciones molares de las HBPM, comparadas a pesos equivalentes con HNF, el número de moléculas necesario para producir una actividad biológica semejante, será al menos seis veces superior para las HBPM que para HNF. Se ha demostrado que una molécula de F4P puede unir dos moléculas de heparina por debajo de un peso molecular de 9000 (Bock et al., 1980). Por consiguiente, puede anticiparse que la neutralización de la inhibición de generación de trombina requerirá al menos tres veces más de F4P para neutralizar las HBPM que para hacerlo con HNF, y esto es lo que se observa en los resultados que se presentan en esta memoria (fig. 19, sec. IV.4).

Globalmente, los resultados referidos confirman los encontrados por



Ofosu et al. (1987) y Béguin et al. (1988), y expresan que la inhibición de la generación de trombina en PPP por HNF y las HBPM correlaciona muy bien con sus actividades anti-IIa. No obstante, los resultados en presencia de F4P indican que una porción de su actividad anti-Xa, que es más resistente a la neutralización por F4P, también contribuye a la inhibición de generación de trombina; esta porción es más elevada para la mayoría de las HBPM que para HNF y podría ser particularmente importante *in vivo*, en condiciones en las que es probable que tenga lugar la activación de plaquetas .

Las concentraciones de las HBPM requeridas para inhibir la generación de trombina fueron de 2 a 5 veces superiores a la concentración de HNF en PPP, y en consecuencia la neutralización de su actividad por F4P en este sistema es mucho menor que la de HNF, a la misma actividad biológica. Esta diferencia puede contribuir al éxito terapéutico de las HBPM en situaciones en las que ocurra un bajo grado de activación de plaquetas. No obstante, nuestros resultados muestran que cuando se alcanza una concentración suficientemente alta de F4P, la actividad inhibitoria de las HBPM en el sistema de generación de trombina, como sucede con HNF, puede ser completamente neutralizada.

Es posible que otras interacciones de las heparinas con las plaquetas *in vivo* puedan ser importantes, así como con F4P, por lo que se realizaron estudios subsiguientes de las actividades de las HBPM en plasma rico en plaquetas. Este aspecto constituyó otro de los objetivos del presente trabajo.

Se ha demostrado que HNF(PI), a la concentración que inhibía casi completamente la generación de trombina en PPP (1  $\mu\text{g/ml}$  o 0.19 UI/ml), apenas influenciaba la cantidad de trombina formada en PRP. Sin embargo, 2  $\mu\text{g}$  de HBPM(PI), actividad inhibitoria (80%) equivalente a 1  $\mu\text{g}$  de HNF

cuando ambas preparaciones se valoraron en PPP, producían aproximadamente un 50% de inhibición de la trombina generada en un medio de PRP. Es interesante subrayar que estos efectos anticoagulantes diferentes, de 1  $\mu\text{g}$  de HNF y 2  $\mu\text{g}$  de HBPM sobre PRP, se encontraron también cuando 14  $\mu\text{g}$  de F4P se adicionaron a PPP, indicando que la principal acción neutralizante de las plaquetas es así debida al F4P.

Los resultados que se presentan son, a bajas concentraciones de HNF, en principio similares a los descritos por Béguin et al. (1989). Estos autores encontraron que concentraciones de 0.1 UI/ml (0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), que podían sustancialmente inhibir generación de trombina en PPP, apenas eran efectivas en PRP. Sin embargo, el principal efecto que detectaron dichos investigadores al incrementar las concentraciones de heparina a 0.3 UI/ml, fue una prolongación sustancial de la fase de retraso antes del desarrollo de trombina, pasando de 4 minutos a alrededor de 20 minutos y no dándose prácticamente inhibición de la cantidad de trombina generada. Incluso a 0.5 UI/ml de HNF, se producía solamente un 20 % de inhibición de la concentración del pico de trombina. Por el contrario, en nuestros resultados (tabla 29, sec.IV.54), incrementando la concentración de HNF a 0.3 UI/ml (1.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se obtenía un 50% de inhibición de la cantidad de trombina generada, y a 0.5 UI/ml (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aparecía un 80% de inhibición; existía además una prolongación marginal de la fase de retraso del desarrollo de trombina, a un máximo de 5 minutos.

La principal diferencia entre los dos sistemas radica en que Béguin et al. (1989) utilizaron tromboplastina diluída para estimular la generación de trombina, mientras que en los resultados que se recogen en esta memoria se utilizó una activación por contacto con vidrio, en ausencia de tromboplastina. El efecto más sobresaliente de tromboplastina en PRP sería reducir la fase de

retraso de generación de trombina, debido a la generación de pequeñas cantidades de trombina que activan las plaquetas para producir fosfolípido procoagulante; la acción de la heparina es inhibir estas primeras trazas de trombina. Parece difícil explicar por lo tanto la marcada falta de efecto de HNF, observada en PRP por los investigadores mencionados, únicamente en términos de neutralización de la heparina por F4P. Si es verdad que 1 ml de PRP puede generar suficiente F4P para neutralizar 0.5 UI/ml de HNF, se debería esperar una similar falta de efecto en nuestro sistema de PRP; sin embargo, a 0.5 UI/ml se encontró un 80% de inhibición de generación de trombina (fig. 22 y 29, tabla 29, sec. IV.2).

Una posible explicación de estas diferencias descansa en la capacidad neutralizante de heparina por tromboplastina, como se describió originalmente por Gomperts et al. (1978). Es posible que heparina y tromboplastina actúen como antagonistas mutuos, de forma que la heparina neutralice la tromboplastina causando un retraso en la generación de trombina, y la tromboplastina neutralice la heparina de forma tal que no haya inhibición de trombina una vez que ésta se forma.

Hemker (1987) indicó que las HBPM pueden inhibir la generación de trombina en PRP, y aunque no se daban datos en su publicación, se indicaba que el efecto neutralizante de plaquetas sobre heparina podía ser menor para las HBPM que para HNF. Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman esta suposición, y proveen datos cuantitativos que informan que las potencias de HBPM, relativas a HNF, son aproximadamente 2 veces superiores en PRP que en PPP (tabla 33, sec. IV.5).

El hecho de que las potencias relativas de todas las HBPM, obtenidas en PRP frente a HNF, fueran de forma constante dos veces superiores a

aquéllas de PPP, significa que todas las HBPM se neutralizan en una proporción similar por F4P. Los valores de inhibición más elevados de las HBPM en PRP que en PPP+F4P (tabla 34, sec.IV.5) podían indicar alguna implicación adicional de las plaquetas enteras, pero los datos en la tabla muestran que estas diferencias son bastante menores. Los valores de CE50, que son una indicación de la cantidad de heparina necesaria para inhibir una misma cantidad de trombina, resultaban en PRP alrededor de 3 veces superiores a los encontrados en PPP, pero 5 veces en el caso de HNF. Es decir, que todas las HBPM fueron menos afectadas que HNF por la presencia de plaquetas, aunque hay aún un impacto significativo sobre las concentraciones requeridas para su actividad anticoagulante.

Las potencias relativas de las HBPM en PRP valoradas frente a HNF, se compararon también con las actividades específicas obtenidas para los mismos materiales en ensayos amidolíticos de actividad anti-Xa y anti-IIa. A diferencia de la situación con PPP, donde las actividades anti-IIa dieron una mejor correlación con la inhibición de generación de trombina que las actividades anti-Xa, los coeficientes de correlación con PRP fueron aproximadamente los mismos para los ensayos anti-IIa que para los ensayos anti-Xa. Esto es probablemente debido a que en PRP los oligosacáridos de peso molecular más elevado, que tienen mayor actividad anti-IIa, son también los más fácilmente neutralizados por F4P; los oligosacáridos más pequeños, con actividad anti-Xa solamente, son más resistentes a la neutralización por F4P (Lane et al., 1984), y por consiguiente llegan a ser más influyentes en PRP que en PPP, como sugirieron Hemker y Béguin (1992).

En resumen, a causa de que el F4P neutraliza menos las HBPM que la HNF, se consideró que sus actividades relativas podían ser bastante diferentes en una situación donde hubiera extensa activación de plaquetas. Sin embargo,

el papel de las plaquetas en la patogénesis de la trombosis venosa, como opuesto a la trombosis arterial, es relativamente menor (Thomas, 1994) y la significación de estos descubrimientos en la situación *in vivo* es incierta. Es posible que aparte de las observaciones indicadas, las principales diferencias entre HNF y las HBPM se encuentren, probablemente, en sus propiedades farmacológicas.

Los resultados de los estudios de acción antitrombótica en conejos que se presentan en esta memoria muestran por vez primera datos comparativos, en el mismo modelo animal, de la eficacia antitrombótica de las cuatro principales HBPM disponibles comercialmente. Se utilizó una modificación del modelo clásico de estasis de Wessler, en la que la extensión de trombosis se evaluó después de 20 min. de estasis, además de los 10 min. establecidos en el modelo original. Thomas et al. (1989b) mostraron que 20 min. de estasis producían un desafío trombogénico más severo, y por ello requerían dosis más elevadas de HBPM(PI) para alcanzar un efecto antitrombótico. Los resultados presentados en esta memoria, como se muestra en la tabla 42 (sección IV.6), confirman y amplían los encontrados por Thomas et al. Los valores DE50 a 20 min. de estasis fueron más elevados que los obtenidos a 10 min. de estasis para todas las HBPM analizadas, así como para HNF. La relación entre las DE50, a 10 y 20 min. de estasis, fue más bien similar para todas las heparinas (rango 1.5 a 1.8), excepto para FRG, en la que se obtuvo un valor de 2.9, no conociéndose la razón para esta diferencia.

A partir de los valores de DE50 en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso de conejo, y un volumen de plasma asumido para el conejo de 40 ml/kg, se pudieron calcular las actividades anticoagulantes asociadas con el efecto antitrombótico, en los distintos sistemas de ensayo (anti-Xa, anti-IIa e inhibición de generación de trombina). A partir de estos cálculos (tabla 45, sec. IV.6) pudo observarse que

el 50% de inhibición de trombosis se asociaba con niveles similares de inhibición de generación de trombina en PPP semejantes para todas las preparaciones; 66-84 % para 10 min. de estasis y 81-88 % para 20 min. de estasis. Sin embargo debe reconocerse que esto está basado sobre una asunción de 100 % de recuperación en la circulación, y sobre datos obtenidos con plasma humano. Los valores reales de inhibición de generación de trombina en el plasma de conejo pueden ser diferentes. Algunos datos preliminares sobre la inhibición de generación de trombina en muestras de plasma, tomadas de los conejos utilizados en los experimentos de trombosis que se describen, se han obtenido por la Dra. Gray en el NIBSC (comunicación personal). Estos datos indican que la inhibición de generación de trombina correspondiente a los valores DE50 a 10 min. de estasis fue alrededor de 30-50 %, es decir de alguna forma inferiores a los valores calculados. Sin embargo, para los valores DE50 a 20 min. de estasis, los valores encontrados en el plasma de conejo se encontraban fundamentalmente en el rango calculado, esto es, en torno al 80-90 %. Globalmente, parece que hay una relación entre el grado de inhibición de trombosis a 10 min. de estasis y el grado de inhibición de generación de trombina de las HBPM, mientras que con un mayor desafío trombogénico de 20 min. de estasis, se requería un grado de inhibición mayor de generación de trombina para producir un efecto antitrombótico.

Cuando las potencias antitrombóticas de las HBPM se compararon con sus actividades anticoagulantes en los ensayos clásicos, como se indica en la tabla 45 (sec. IV.6), fue evidente que el 50 % de la actividad antitrombótica estaba asociada con valores muy similares de actividad anti-IIa para todas las heparinas, mientras que las actividades anti-Xa cubrieron un amplio rango de dispersión. Esta diferencia en correlación de las actividades antitrombóticas con los dos sistemas anticoagulantes se confirmó por los coeficientes de

correlación de  $r=0.992$  ( $p=0.008$ ) a 10 min. de estasis y  $r=0.982$  ( $p=0.018$ ) a 20 min de estasis, para la actividad anti-IIa, y  $r=0.425$  ( $p=0.575$ ) y  $r=0.143$  ( $p=0.857$ ) para la prevención de trombosis a 10 y 20 min de estasis comparada con la actividad anti-Xa. Sería interesante comparar los niveles de sangre calculados y asociados con la actividad antitrombótica en el conejo con los encontrados en pacientes a los que se administran dosis antitrombóticas de HBPM para la prevención de TVP. Sin embargo tales comparaciones son difíciles de hacer ya que en muchos ensayos clínicos los niveles de sangre no se recogen, e incluso cuando éstos se miden lo han sido generalmente solo en términos de actividad anti-Xa. Los datos de Thomas y Merton (1982) muestran que cuando las dosis antitrombóticas de una HBPM, Fraxiparina, se administró subcutáneamente a voluntarios sanos, los niveles máximos en sangre por APTT, que están estrechamente relacionados con la actividad anti-IIa, fueron aproximadamente 0.05 UI/ml. Este valor es considerablemente más bajo que los valores anti-IIa encontrados en la presente investigación, incluso considerando las actividades antitrombóticas más bajas de DE50 a 10 min. de estasis (tabla 45, sec. IV.6). Es posible que, como en el caso de generación de trombina, los valores reales de actividad anti-IIa que se encontrarían en el conejo puedan ser inferiores a los calculados. Sin embargo, aún teniendo en cuenta esto, parece probable que el estímulo trombogénico asociado con la aparición de TVP en los seres humanos sea inferior al utilizado en los experimentos en el conejo, y por ello las acciones antitrombóticas de HNF y de HBPM pueden alcanzarse con niveles inferiores en sangre.

Amar et al. (1990), informaron que las potencias antitrombóticas relativas de HNF y HBPM en el modelo de estasis de Wessler eran dependientes de la naturaleza del estímulo de trombosis. Estos autores encontraron una buena correlación entre acciones antitrombóticas y actividad

anti-IIa cuando utilizaron tromboplastina como estímulo trombogénico. Sin embargo, cuando se utilizó suero humano, las actividades anti-Xa se mostraron más importantes.

Aunque en los estudios efectuados en el trabajo que se presenta se utilizó suero humano, no se encontró correlación entre las potencias antitrombóticas y la actividad anti-Xa. De esta manera, nuestros resultados parecen contradecir los obtenidos por Amar et al., 1990. La principal razón para ello es, muy probablemente, las diferencias técnicas en el modelo animal estudiado. Tal como ya indicaron los autores mencionados, puede encontrarse que, dependiendo de los grupos de estudio, un mismo componente, como el pentasacárido, presente amplias diferencias en actividad antitrombótica en el modelo de estasis de Wessler. En este sentido, en el modelo experimental utilizado por los citados investigadores, la dosis de suero humano empleada como estímulo trombogénico fue de 0.75 ml/kg, lo que es casi la mitad de la cantidad de suero que ha sido utilizado en los experimentos recogidos en esta memoria, así como en el modelo original descrito por Wessler (1959). Es decir, el desafío trombogénico en el estudio de Amar et al. (1990) era más bajo, requiriendo una dosis inferior de HBPM para alcanzar un efecto antitrombótico. La DE50 de FRX en el referido estudio, utilizando 15 minutos de estasis, podía estimarse en aproximadamente 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que en nuestro trabajo la DE50 ha sido de 194  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 10 minutos de estasis y de 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 20 minutos de estasis (tabla 42, sec. IV.6)). Por otro lado, la actividad de HNF parece no estar tan afectada por estas diferencias técnicas, y por ello las potencias antitrombóticas de HBPM, relativas a HNF, son bastante diferentes entre los dos estudios. Además, aunque en los datos recogidos por Amar et al. (1990) la actividad anti-Xa era más importante con suero humano como estímulo que con tromboplastina, la dispersión de los valores anti-Xa asociados con una acción antitrombótica equivalente en las tres HBPM



estudiadas todavía cubrían un rango superior a un factor 3, hecho que implica que la correlación entre actividad antitrombótica y anti-Xa no podía estimarse como muy buena.

En otro estudio del mismo grupo, Carrie et al. (1993) encontró que HNF y tres HBPM eran, para el mismo efecto antitrombótico, equipotentes en términos de unidades anti-Xa, pero no de unidades anti-IIa. Sin embargo, en las investigaciones llevadas a cabo por dichos autores, el modelo animal utilizado fue el aumento de fibrina en conejos, que está probablemente más relacionado con el tratamiento de trombosis establecida que con profilaxis. En esta situación, las plaquetas pueden jugar un papel más importante que en el modelo Wessler, y es interesante indicar que en los experimentos realizados con PRP en el presente trabajo, la inhibición de generación de trombina por HBPM se correlacionó tanto con la actividad anti-Xa como con la actividad anti-IIa. Los datos de Carrie et al. (1993) no son por tanto incompatibles con los resultados recogidos en esta memoria.

De forma global la investigación realizada muestra que, en el modelo animal estudiado, las HBPM, como grupo, son agentes antitrombóticos menos efectivos que HNF, existiendo además amplias diferencias entre las diversas HBPM en cuanto a sus potencias antitrombóticas. Las bajas actividades antitrombóticas de las HBPM están en concordancia con su menor acción inhibitoria sobre la generación de trombina, lo cual a su vez puede explicarse por sus bajas actividades anti-IIa. La principal dificultad con estas observaciones es que no explican la indudable eficacia clínica que presentan las HBPM a dosis, en general, sustancialmente inferiores que las de HNF. Existe actualmente una amplia evidencia clínica de que las HBPM son al menos tan eficaces como la HNF, cuando se comparan en términos de peso, en la prevención de TVP en cirugía general, y pueden ser más eficaces en la

profilaxis de cirugía ortopédica y para el tratamiento de trombosis establecida (para revisión Hirsh y Levine, 1992; Nurmohamed et al., 1992).

La principal razón para la diferencia entre los resultados animales y los datos clínicos es la vía de administración. Para profilaxis, estas preparaciones se administran invariablemente por vía subcutánea, y así las HBPM consiguen una importante ventaja sobre HNF; tienen todas ellas aproximadamente un 100 % de biodisponibilidad, comparadas con menos de un 30% en el caso de HNF. La razón para ello es que las cadenas de polisacáridos más cortas, presentes en las HBPM, son absorbidas a través de los tejidos mucho más fácilmente que las cadenas más largas que predominan en HNF, además de interaccionar más débilmente con el endotelio (Tobelem, 1989; Psuja, 1988). El resultado de ambas características son niveles en sangre más elevados y semividas biológicas más largas para las HBPM, en comparación con HNF. Los experimentos en conejos llevados a cabo en el presente trabajo, se realizaron unos pocos minutos después de la inyección intravenosa de cada una de las HBPM, y por consiguiente las diferencias en absorción o vida media no pueden tomarse en cuenta.

Considerando las diferencias entre las diversas HBPM, los datos clínicos indican de nuevo diferencias mucho más pequeñas que las encontradas en los animales aquí estudiados, y también una mejor correlación entre la actividad antitrombótica y las actividades anti-Xa, en comparación con las actividades anti-IIa. Como ejemplo se puede indicar que las dosis de HBPM recomendadas para profilaxis de TVP en cirugía general, varían desde aproximadamente 15 a 40 mg (peso seco), 2000 a 3500 UI (ensayo anti-Xa) y 500 a 2500 UI (ensayo anti-IIa), mientras que en los experimentos realizados en nuestro modelo animal, las dosis antitrombóticas fueron casi idénticas cuando se expresaron en unidades anti-IIa, pero cubrían un rango de factor cinco cuando

se expresaron ya sea como peso seco o unidades anti-Xa. Existen dos razones principales para estas diferencias. Primero, la biodisponibilidad de las cadenas de heparina disminuye cuando aumenta el peso molecular (Johnson et al., 1976; Lane et al., 1979). Las preparaciones de HBPM con alta actividad anti-IIa contienen una proporción relativamente elevada de cadenas más largas y tras la administración por vía subcutánea solamente una parte de éstas aparecerán en la circulación. Para las preparaciones con baja actividad anti-IIa, sin embargo, las moléculas con actividad anti-IIa son todas de peso molecular relativamente bajo, y por consiguiente serán todas recuperadas casi completamente después de inyección subcutánea. Por consiguiente, las diferencias en actividad anti-IIa vistas *in vitro*, o después de inyección intravenosa, entre LOG y CLX, por ejemplo, tenderán a desaparecer después de una inyección subcutánea.

En segundo lugar, la aparentemente mayor relevancia de la actividad anti-Xa en circunstancias clínicas puede reflejar una importancia genuinamente mayor de la acción anti-Xa *in vivo*. En el primer caso, la dependencia que la biodisponibilidad de estos preparados tiene de su tamaño molecular, tenderá a aumentar la actividad anti-Xa comparada con la actividad anti-IIa. Como ya se ha mencionado solo una porción de las moléculas con actividad anti-IIa entrará en la circulación, mientras que casi todas las moléculas con actividad anti-Xa serán recuperadas, resultando una relación anti-Xa/anti-IIa incrementada en comparación con medidas intravenosas o *in vitro* (Thomas et al., 1981). Además, aunque la actividad anti-Xa sea claramente no muy efectiva para mejorar la inhibición de generación de trombina *in vitro*, como se ha mostrado por Hemker (1987) y en los experimentos que se recogen en la presente memoria, la situación puede ser diferente *in vivo*, donde la generación de trombina es un proceso dinámico que tiene lugar en sangre circulante. Una vez que la generación de trombina ha tenido lugar, es probable que el complejo

de protrombinasa se rompa, al ser inactivado el factor V por la proteína C activada, y se puede liberar factor Xa libre. Si este factor Xa libre permaneciera como tal, podría promover más generación de trombina en la circulación a partir del estímulo inicial. Por consiguiente, la inhibición de factor Xa libre por HBPM puede ser un mecanismo importante para prevenir la extensión de un pequeño trombo desde su lugar inicial de origen. Si esta hipótesis es cierta, la importancia de esta actividad anti-Xa no quedaría reflejada ya sea en ensayos *in vitro* o en el modelo de Wessler de estasis en el conejo, donde la distribución de factor Xa libre en la sangre es impedida por la unión a las paredes de los vasos sanguíneos.

## **VI. CONCLUSIONES**

Como consecuencia de las investigaciones realizadas, se exponen a continuación las conclusiones que se han obtenido en respuesta a los objetivos planteados:

1. Las preparaciones de HBPM estudiadas fueron menos potentes que la HNF, como inhibidores de generación de trombina en PPP, cuando se compararon en términos de concentración en peso. La inhibición de generación de trombina en PPP, mostró una mejor correlación con su actividad anti-IIa que con su actividad anti-Xa, actividades obtenidas en ensayos amidolíticos.
2. Todas las HBPM estudiadas fueron menos neutralizadas que la HNF, por 14  $\mu\text{g}$  de F4P, cuando se valoraron a concentraciones que dieron la misma actividad biológica en el sistema de generación de trombina, aunque el grado de neutralización no fue el mismo para todas las HBPM. Esta diferencia entre HNF y las HBPM se debe prioritariamente, a las más altas concentraciones molares de las HBPM que se requieren para obtener la misma actividad inhibitoria.
3. A concentraciones más elevadas de F4P, las actividades de las HBPM en generación de trombina y en ensayos anti-IIa pudieron ser completamente neutralizadas, aun cuando permanecía una considerable actividad anti-Xa. Esta actividad residual anti-Xa, que no se neutraliza por F4P, indica que no tiene una importante contribución en la inhibición de generación de trombina.
4. La potencia de las HBPM en PRP fue superior a la encontrada en PPP, aunque todavía inferior que la de HNF. Para cada HBPM, la potencia en PRP en relación con HNF, fue de forma constante el doble de la obtenida en PPP, confirmando la menor neutralización de las HBPM por F4P.

5. La capacidad inhibitoria de generación de trombina de HNF y de las HBPM en PRP, fue similar a la encontrada en PPP en presencia de F4P, indicando que el efecto neutralizante en presencia de plaquetas era debido principalmente a F4P.

6. La inhibición de generación de trombina en PPP por las HBPM, valoradas frente a HNF, muestra una relación más próxima con la acción antitrombótica *in vivo* que la inhibición obtenida en un medio de PRP. Ello sugiere que los ensayos en presencia de plaquetas no son predictivos de la acción antitrombótica *in vivo*, al menos en el modelo animal estudiado.

7. Las actividades anti-Xa *in vitro* no son un buen indicador de la acción antitrombótica de las HBPM. Por el contrario, las actividades anti-IIa y de inhibición de generación de trombina en el sistema intrínseco, correlacionaron bien con los efectos antitrombóticos de estos preparados.

8. Para obtener la misma actividad antitrombótica que HNF, debe administrarse también la misma actividad anti-IIa de las HBPM. Por consiguiente, parece que una cierta proporción de actividad anti-IIa de HNF y de las HBPM, soportada por las moléculas de masa superior a 5400 daltons, será necesaria en las HBPM para mostrar su efecto antitrombótico óptimo.

Considerados globalmente, los resultados indican que la menor neutralización de las HBPM por F4P no sería importante para su efecto terapéutico en humanos, al menos en la prevención de trombosis. El hecho de que las HBPM sean tan eficaces como la HNF, en la prevención de trombosis en cirugía, a dosis más bajas, y a pesar de su baja actividad anti-IIa, indica que su mayor biodisponibilidad es la más importante contribución para el éxito terapéutico de estas preparaciones.

## VII. BIBLIOGRAFIA



## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abildgaard U. Highly purified ATIII with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 21: 89-91.
- Abildgaard U. Antithrombin and related inhibitors of coagulation. *Recent Adv. Blood Coagul.* 1981; 3: 151.
- Albada J., Nieuwenhuis H.K., Sixma J.J. Treatment of acute venous thromboembolism with low molecular weight heparin (Fragmin). Results of a double-blind randomised study. *Circulation* 1989; 80: 935-40.
- Amar J., Caranobe P., Sie P., Boneu B. Antithrombotic potencies of heparins in relation to their antifactor Xa and antithrombin activities: an experimental study in two models of thrombosis in the rabbit. *Br. J. Haematol.* 1990; 76: 94-100.
- Andersson L.O., Bäckström G.E., Fransson L.A., Holmer E., Lindahl U., Sandberg I., Söderström E., Thunberg J. US Patent N° 4303651, 1981.
- Andersson L.O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A., Sims G.E.C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb. Res.* 1976; 9: 575-83.
- Aronson D.L. and D.P. Thomas. Experimental studies on venous thrombosis: effect of coagulants, procoagulants and vessel contusion. *Thromb. Haemost.* 1985; 54: 866-70.

Bach R., Nemerson Y., Konigsberg W. Purification and characterization of bovine tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 8324-31.

Barrowcliffe T.W., Curtis A.D. Principles of bioassay of haemostatic components. En: Bloom AL, Thomas DP eds. *Haemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 996-1004.

Barrowcliffe T.W., Curtis A.D., Johnson E.A., Thomas D.P. An International Standard for Low Molecular Weight Heparin. *Thromb. Haemost.* 1988; 60(1): 1-7.

Barrowcliffe T.W., Curtis A.D., Tomlinson T.P., Hubbard A.R., Johnson E.A., Thomas D.P. Standardisation of low molecular weight heparins: a collaborative study. *Thromb. Haemost.* 1985; 54: 675-79.

Barrowcliffe T.W. and Gray E. Studies of phospholipid reagents used in coagulation. II: Factors influencing their sensitivity to heparin. *Thromb. Haemost.* 1981; 46: 634-37.

Barrowcliffe T.W., Havercroft S.J., Kembell-Cook G., Lindahl U. The effect of  $Ca^{2+}$ , phospholipid and Factor V on the anti-(Factor Xa) activity of heparin and its high-affinity oligosaccharides. *Biochem. J.* 1987; 243: 31-7.

Barrowcliffe T.W., Johnson E.A., Eggleton C.A., Kembell-Cook G., Thomas D.P. Anticoagulant activities of high and low molecular weight heparin fractions. *Br. J. Haematol.* 1979; 41: 573-83.

Barrowcliffe T.W., Johnson E.A., Eggleton C.A., Thomas D.P. Anticoagulant activities of lung and mucosal heparins. *Thromb. Res.* 1978; 12: 27-36.

- Barrowcliffe T.W., Le Shirley Y. The effect of calcium chloride on anti-Xa activity of heparin and its molecular weight fractions. *Thromb. Haemost.* 1989; 62: 950-54.
- Barrowcliffe T.W., Merton R.E., Havercroft S.J., Thunberg L., Lindahl U, Thomas D.P. Low-affinity heparin potentiates the action of high-affinity heparin oligosaccharides. *Thromb. Res.* 1984; 34: 125-33.
- Barrowcliffe T.W., Stocks J., Gray E. Preparation of a stable phospholipid reagent for coagulation assays. *Haemostasis* 1982; 11: 96-101.
- Barrowcliffe T.W., Thomas D.P. Anticoagulant activities of heparin and fragments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989; 556: 132-45.
- Bauer K.A., Rosenberg R.D. The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: Insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood* 1987; 70: 343-50.
- Béguin S., Lindhout T., Hemker H.C. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb. Haemost.* 1988; 60: 457-62.
- Béguin S., Lindhout T., Hemker H.C. The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb. Haemost.* 1989; 61(1): 25-59.
- Bergqvist D., Nilsson B., Hedner U., Petersen P.C., Ostergaard P.B. The effect of heparin fragments of different molecular weights on experimental thrombosis and haemostasis. *Thromb. Res.* 1985; 38: 589-601.

Bergsagel D.E., Nockolds E.R. The activation of proaccelerin. Br. J. Haematol. 1965; 11: 395-410.

Biggs R., Denson K.W.E., Akman N., Borrett R., Hadden M. Antithrombin III, Antifactor Xa and Heparin. Br. J. Haematol. 1970; 19: 283-305.

Biggs R., McFarlane R.G., Denson K.W.E., Ash B.J. Thrombin and the interaction of factors VIII and IX. Br. J. Haematol. 1965; 11: 276-95.

Björk I., Olson S.T., Shore J.D. Molecular mechanisms of the accelerating effect of heparin on the reactions between antithrombin and clotting proteinases. En: Lane DA, Lindahl U eds. Heparin. London: Edward Arnold, 1989: 229-56.

Blombäck B. Specificity of thrombin and its action on fibrinogen. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1986; 485: 120-23.

Bock P.E., Luscombe M., Marshall S.W., Pepper D.S, Holbrook J.J. The multiple complexes formed by the interaction of platelet factor 4 with heparin. Biochem. J. 1980; 191: 769-76.

Breøderveld K., Giddings J.C., ten Cate J.W., Bloom A.L. The localization of factor V within normal human platelets and the demonstration of a platelet-factor V antigen in congenital factor V deficiency. Br. J. Haematol. 1975; 29(3): 405-12.

Brinkhous K.M., Smith H.P., Warner E.D., Seegers W.H. The inhibition of blood clotting. An unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin to thrombin.

Am. J. Physiol. 1939; 125: 683.

Broze G.J., Girard T.J., Novotny W.F. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* 1990; 29: 7539-46.

Campbell P.J. International biological standards and reference preparations: I. Preparation and presentation of materials to serve as standards and reference preparations. II. Procedures used for the production of biological standards and reference preparations. *J. Biol. Stand.* 1974; 2: 249-67.

Carroll R.W., Christey P.B., Boswell D.R. Serpins: antithrombin and other inhibitors of coagulation and fibrinolysis. Evidence from amino acid sequences. En: Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J eds. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven: Leuven University Press, 1987: 1-15.

Carrie D., Caranobe C., Boneu B. A comparison of the antithrombotic effects of heparin and of low molecular weight heparins with increasing anti-factor Xa/anti-factor IIa ratio in the rabbit. *Br. J. Haematol.* 1993; 83: 622-6.

Casu B., Oreste P., Torri G., Zoppetti G., Choay J., Lormeau J.C., Petitou M., Sinay P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-factor Xa activity containing the minimal antithrombin III binding sequence. *Biochem. J.* 1981; 197: 599-609.

Chesney C. Mcl., Pifer D.D., Colman R.W. The role of platelet factor V in prothrombin conversion. *Thromb. Res.* 1983; 29: 75-84.

Choay J. Structure and activity of heparin and its fragments: An overview.

Semin. Thromb. Haemost. 1989; 15: 359-64.

Choay J., Petitou M., Lormeau J.C., Sinay P., Casu B., Gatti G. Structure-activity relationship in heparin; a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983; 116: 492-9.

Cifonelli J.A., King J. The distribution of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose residues in mammalian heparins. Carbohydr. Res. 1972; 21: 173-86.

Conley L.C., Hartman R.C., Lalley J.S. The relationship of heparin activity to platelet concentration. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948; 69: 284-7.

Curtis A.D., Kerry P.J. Standardization of  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor 4: A collaborative study to investigate the sources and extent of variation in the measurement of platelet specific proteins. Thromb. Haemost. 1983; 50 (3): 686-9.

Dahlbäck B. Protein S and C4b-Binding Protein: Components Involved in the regulation of the Protein C Anticoagulant System. Thromb. Haemost. 1991; 66 (1): 49-61.

Dawes J., Smith R.C., Pepper D.S. The release, distribution and clearance of human  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor 4. Thromb. Res. 1978; 12(5): 851-61.

Diness V., Nielsen J.I., Pedersen P.C., Wolffbrandt K.H., Ostergaard P.B. A comparison of the antithrombotic and haemorrhagic effects of a low molecular weight heparin (LHN-1) and conventional heparin.

- Thromb. Haemost. 1986; 55: 410-4.
- Dittman W.A., Majerns P.W. Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant. Blood 1990; 75: 329-36.
- Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. Thromb. Diath. Haemorrh. 1965; 13: 516.
- Einarsson R., Andersson L.O. Binding of heparin to human antithrombin III as studied by measurement of tryptophan fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 1977; 490: 104-11.
- Ellis V., Scully M.F., Kakkar V.V. The acceleration of the inhibition of platelet prothrombinase complex by heparin. Biochem. J. 1986; 233: 161-5.
- Esmon C.T. Protein C: Biochemistry, Physiology and Clinical Implications. Blood 1983; 62: 1155-8.
- Esmon C.T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. J. Biol. Chem. 1989; 264: 4743-6.
- European Pharmacopoeia. Low Molecular Mass Heparin. 1993(a); Monograph 828.
- European Pharmacopoeia. Statistical Analysis. 1993(b); 2nd Edition: Part I, VIII.13.
- Fenton II J.N., Fasco M.J., Stackrow A.B., Aronson D.L., Young A.M., Finlayson J.S. Human thrombins: Production, evaluation and properties

of  $\alpha$ -thrombins. *J. Biol. Chem.* 1977; 252: 3587-98.

Finney D.J. *Statistical methods in biological assay*. 3rd Edition. London: Griffin & Co. Ltd., 1978.

Fuchs H.E., Pizzo S.V. Regulation of factor Xa in vitro in human and mouse plasma and in vivo in the mouse. Role of the endothelium and plasma proteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 2041-9.

Fuchs H.E., Trapp H.G., Griffith M.J., Roberts H.R., Pizzo S.V. Regulation of factor IXa in vitro in human and mouse plasma and in vivo in the mouse. Role of the endothelium and the plasma proteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 1984; 73: 1696-703.

Gaffney P.J., Heath A.B. and Fenton II J.W. A collaborative study to establish an international standard for alpha thrombin. *Thromb. Haemost.* 1992; 67 (4): 424-7.

Gitel S.N., Medina V.M., Wessler S. Inhibition of human activated factor X by antithrombin and  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor in human plasma. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 6890-5.

Gomperts E.D., Zucker M.L. Heparin, brain thromboplastin and the insensitivity of the prothrombin time to heparin activity. *Thromb. Res.* 1978; 12: 105-17.

Gray E., Watton J., Casmelli S., Barrowcliffe T.W., Thomas D.P. Experimental studies on a recombinant hirudin, CGP 39393. *Thromb. Haemost.* 1991; 65: 355-9.



Handøland G., Abildgaard U. Assay of unfractionated and LMW heparin with chromogenic substrates: twin methods with factor Xa and thrombin. *Thromb. Res.* 1984; 35: 627-36.

Harenberg J., Giëse Ch., Knodler A., Zimmermann R., Schettler G. Neutralisierung von niedermolekularem Heparin Kabi 2165 mit Protaminchlorid. *Klin. Wochenschr.* 1986; 64: 1171-5.

Harpel P.C. Blood proteolytic enzyme inhibitors: their role in modulating blood coagulation and fibrinolytic enzyme pathways. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW eds. *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2nd edition. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1987: 219-34.

Hemker H.C. The mode of action of heparin in plasma. En: Verstraete M, Vermijlen J, Lijnen R, Arnout J eds. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven: International Society on Thrombosis and Haemostasis and Leuven University Press, 1987: 17-36.

Hemker H.C., Béguin S. The mode of action of heparins *in vitro* and *in vivo*. En: Lane DA, Björk I, Lindahl U, eds. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Heparin and related polysaccharides*. New York: Plenum Press, 1992: 221-30.

Hirsh J., Levine M.N. Low Molecular Weight Heparin. *Blood* 1992; 79: 1-17.

Holmøer E., Lindahl U., Bäckström L., Thunberg H., Söderström G., Andersson L.O. Anticoagulant activities and effects on platelets of a heparin fragment with high affinity for antithrombin. *Thromb. Res.* 1980; 18: 861-9.

Holmer E., Mattson C., Nilsson S. Anticoagulant and antithrombotic effects of heparin and low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb. Res.* 1982; 25: 475-85.

Holmer E., Soderstrom G. Neutralisation of unfractionated heparin and a low molecular weight (LMW) heparin fragment by protamine. *Thromb. Haemost.* 1983; 50: 103.

Höök M., Björk I., Hopwood J., Lindahl U. Anticoagulant activity of heparin; separation of high activity and low activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Lett.* 1976; 66: 90-3.

Howell W.H. The purification of heparin and its presence in blood. *Am. J. Physiol.* 1925; 71: 553.

Howell W.H., Holt E. Two new factors in blood coagulation-heparin and pro-antithrombin. *Am. J. Physiol.* 1918; 47: 328.

Hull R.D., Pineo G.F. Treatment of venous thromboembolism with low molecular weight heparins. *Haematol. Oncol. Clin. North Am.* 1992; 6(5): 1095-103.

Hull R.D., Raskob G.E., Pineo G.F., Green D., Trowbridge A.A., Elliot C.G., Lerner R.G., Hall J., Sparling T., Brettell H.R., Norton J., Carter C.J., George R., Merli G., Ward J., Mayo W., Rosenbloom D., Brant R. Subcutaneous low molecular weight heparin compared with continuous intravenous heparin in the treatment of proximal-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 975-82.

- Jackson C.M. The biochemistry of prothrombin activation. En: Bloom AL, Thomas, DP eds. Haemostasis and Thrombosis. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 163-91.
- Jackson C.M., Nemerson Y. Blood Coagulation. Ann. Rev. Biochem. 1980; 49: 765-811.
- Johnson E.A., Kirkwood T.B.L., Stirling Y., Perez-Requejo J.L., Ingram G.I.C., Bangham D.R., Brozovic M. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. Thromb. Haemost. 1976; 35: 586-91.
- Johnson E.A., Mulloy B. The molecular weight range of mucosal heparin preparations. Carbohydr. Res. 1976; 51: 119-27.
- Lam L.H., Silbert J.E., Rosenberg R.D. The separation of active and inactive forms of heparin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976; 69: 570-7.
- Lammle B., Griffin J.H. Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. Clin. Haematol. 1985; 14: 281-342.
- Lane D.A., Caso R. Antithrombin; structure, genomic organization, function and inherited deficiency. Baillières Clin. Haematol. 1989; 2(4): 961-98.
- Lane D.A., Denton J., Flynn A.M., Thunberg L., Lindahl U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. Biochem. J. 1984; 218: 725-32.
- Lane D.A., Macgregor I.R., Michalski R., Kakkar V.V. Anticoagulant activities

of four unfractionated and fractionated heparins. *Thromb. Res.* 1978; 12: 257-71.

Lane D.A., Macgregor T.R., Van Ross M., Cella G., Kakkar V.V. Molecular weight dependence of the anticoagulant properties of heparin. Intravenous and subcutaneous administration of fractionated heparins to man. *Thromb. Res.* 1979; 16: 651-62.

Lane D.A., Pøjler G., Flynn A.M., Thompson E.A., Lindahl U. Neutralization of heparin-related saccharides by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 3980-6.

Laposata M., Dohnarsky D.K., Shin H.S. Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* 1983; 62: 549-56.

Larsen M.L., Abilgaard U., Teien A.N., Gjesdal K. Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNa (S-2238). *Thromb. Res.* 1978; 13: 285-88.

Lindahl U., Bäckström G., Höök M., Thunberg L., Fransson L.A., Linker A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 3198-202.

Lindahl U., Bäckström G., Thunberg L., Leder I.G. Evidence for a 3-O-sulphated D-glucosamine residue in the antithrombin binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77: 6651-5.

Loganathan D., Wang H.M., Mallis L.M., Lindhardt R.J. Structural variation in the antithrombin III binding site region and its occurrence in

- heparin from different sources. *Biochemistry* 1990; 29: 4362-8.
- Lormeau J.C., Petitou M., Choay J. French Patent N° 2503714, 1982.
- Marciniak E. Factor Xa inactivation by antithrombin III: Evidence for biological stabilization of factor Xa by factor V-phospholipid complex. *Br. J. Haematol.* 1973; 24: 391.
- Mardiguian J. French Patent N° 2482603, 1981.
- Mattsson C, Palm M, Söderberg K, Holmer E. Antithrombotic effect of heparin oligosaccharides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989; 556: 323-32.
- McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am. J. Physiol.* 1916; 41: 250.
- Miletich J.P., Jackson C.M., Majerus P.W. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 6908-16.
- Miller K.A., Copeland W.M. Isolation of human thrombin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; 111: 512-4.
- Monkhouse F.C., France E.S., Seegers W.H. Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction adsorbed from plasma by aluminum hydroxide. *Circ. Res.* 1955; 3: 397.
- Moore S., Pepper D.S., Cash J.D. The isolation and characterization of platelet factor 4 released from thrombin aggregated washed human platelets and its dissociation into subunits and the isolation of membrane

- bound antiheparin activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1975; 378: 370-84.
- Morrison S.A., Jesty J. Tissue factor dependent activation of tritium-labelled factor IX and factor X in human plasma. *Blood* 1984; 63: 1338-47.
- Nemerson Y. The reaction between bovine brain tissue factor, factors VII and X. *Biochemistry* 1966; 5: 601-8.
- Nemerson Y. Tissue factor and haemostasis. *Blood* 1988; 71: 1-8.
- Neshelm M E, Mann K G. Modulation of the inhibition of factor Xa by antithrombin III upon incorporation of factor Xa into the prothrombinase complex. *Blood* 1983; 62: Suppl 1, 291.
- Newcombs T.F., Hoshida M. Factor V and thrombin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1965; 17 suppl. 84: 61-9.
- Nielsen J.I. A convenient method for molecular mass determination of heparin. *Thromb. Haemost.* 1992; 68(4): 478-80.
- Nielsen J.I., Ostergaard P. Chemistry of heparin and low molecular weight heparin. *Acta Chir. Scand. Suppl.*, 1988; 543: 52-6.
- Nurmohamed M.T., Rosendaal F.R., Büller H.R., Dekker E., Hommes D.W., Vandenbroucke J.P., Briët E. Low molecular weight heparin versus standard heparin in general and orthopaedic surgery: a meta analysis. *Lancet* 1992; 340: 152-6.
- Ockelford P.A., Carter C.J., Mitchell L., Hirsh J. Discordance between the

anti-Xa activity and the antithrombotic activity of an ultra-low molecular weight heparin fraction. *Thromb. Res.* 1982; 28: 401-9.

Ofosu F.A. Modulation of the enzymatic activity of  $\alpha$ -thrombin by polyanions: Consequences on intrinsic activation of factor V and factor VIII. *Haemostasis* 1991; 21: 240-7.

Ofosu F.A., Blajchman M.A., Modi G.J., Smith L.M., Buchanan M.R., Hirsh J. The importance of thrombin inhibition for the expression of the anticoagulant activity of heparin, dermatan sulphate, low molecular weight heparin and pentosan polysulphate. *Br. J. Haematol.* 1985; 60: 695-704.

Ofosu F.A., Fernandez F., Anvari N., Caranobe C., Dol F., Cadroy Y., Petitou M., Mardiguian J., Sié P., Boneu B. Further studies on the mechanisms for the antithrombotic effects of sulfated polysaccharides in rabbits. *Thromb. Haemost.* 1988; 60: 188-92.

Ofosu F.A., Hirsh J., Esmon C.T., Modi G.J., Smith L.M., Anvari N., Buchanan M.R., Fenton J.W., Blajchman M.A. Unfractionated heparin inhibits the thrombin-catalyzed amplification reaction of coagulation more efficiently than those catalyzed by factor Xa. *Biochem. J.* 1989; 257: 143-50.

Ofosu F.A., Sié P., Modi G.J., Fernandez F., Buchanan M.R., Blajchman M.A., Boneu B., Hirsh J. The inhibition of thrombin-dependent positive-feedback reactions is critical to the expression of the anticoagulant effect of heparin. *Biochem. J.* 1987; 243: 579-88.

Olson S.T., Shore J.D. Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Characterization of the protein fluorescence enhancement. *J.*

- Biol. Chem. 1981; 256: 11065-72.
- Petitou M. Synthetic heparin fragments; new and efficient tools for the study of heparin and its interactions. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1984; 26: 221-6.
- Pieters J., Lindhout T. The limited importance of factor Xa inhibition to the anticoagulant property of heparin in thromboplastin-activated plasma. *Blood* 1988; 72: 2048-52.
- Pieters J., Lindhout T., Hemker H.C. In situ generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor V and factor VIII in thromboplastin-activated plasma. *Blood* 1989; 74: 1021-4.
- Pixloy R.A., Schapira M., Colman R.W. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 1723-9.
- Poller L., Thomson J.M., Yee K.F. Heparin and partial thromboplastin time: An international survey. *Br. J. Haematol.* 1980; 44: 161-5.
- Pomerantz M W, Owen W G. A catalytic role for heparin. Evidence for a ternary complex of heparin cofactor thrombin and heparin. *Biochim. Biophys. Acta* 1978; 535: 66-77.
- Poplawski A., Niewarowski S. Method for determining an antiheparin activity of platelets and erythrocytes. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1965; 13: 149-54.
- Psuja P. Effect of antithrombin III on the binding of heparin and its low molecular weight fraction CY216 to endothelium in culture.



- Acta Haematol. Pol. 1988; 19: 143:9.
- Quick A.J. The normal antithrombin of the blood and its relation to heparin. Am. J. Physiol. 1938; 123: 712.
- Rapaport S.I. Inhibition of factor VIIa /tissue factor induced blood coagulation: With particular emphasis upon a factor Xa-dependent inhibitory mechanism. Blood 1989; 73: 359-65.
- Rapaport S.I. The Extrinsic Pathway Inhibitor: A regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. Thromb. Haemost. 1991; 66 (1): 6-15.
- Robertson I., Gaffney P.J., Bangham D.R. Standard for human thrombin. Thromb. Diath. Haemorrh. 1975; 34: 3-19.
- Rosenberg R.D., Damus P.S. The purification and mechanism of action of human anti-thrombin-heparin cofactor. J. Biol. Chem. 1973; 248: 6490-505.
- Rosing J., v Rijn J.L.M.L., Bøvers E.M., v Dieijen G., Comfurius P., Zwaal R.F.A. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. Blood 1985; 2: 319-32.
- Sakata Y., Cumden S., Lawrence D., Griffin J.H., Loskutoff D.J. Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. Proc. Natl. Sci. USA 1985; 82: 1121-5.
- Schapira M., Scott C.F., James A., Silver L.D., Kueppers F., James H.L.,

- Colman R.W. High molecular weight kininogen or its light chain protects human plasma kallikrein from inactivation by plasma protease inhibitors. *Biochemistry* 1982; 21: 567-72.
- Shoen P., Lindhout T., Franssen J., Hemker C. Low molecular weight heparin-catalyzed inactivation of factor Xa and thrombin by antithrombin III. Effect of platelet factor 4. *Thromb. Haemost.* 1991; 66: 435-41.
- Schoen P., Lindhout T., Willems G., Hemker H.C. Antithrombin III-dependent anti-prothrombinase activity of heparin and heparin fragments. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 10002-7.
- Scott C.F., Schapira M., James H.L., Cohen A.B., Colman R.W. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors. Predominant role of  $\alpha_1$ -protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen. *J. Clin. Invest.* 1982; 69: 844-52.
- Smith G.F. Fibrinogen-The specific thrombin substrate. En: Machovich R ed. *The Thrombin*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1984: 55-82.
- Suzuki K., Dahlbäck B., Stenflo J. Thrombin catalyzed activation of human coagulation Factor V. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 6556-64.
- Tans G., Rosing J. Multicomponent enzyme complexes of blood coagulation. En: Zwaal RFA, Hemker HC eds. *Blood Coagulation*. Amsterdam: Elsevier, 1986: 59-85.
- Thomas D.P. Current status of low molecular weight heparin. *Thromb. Haemost.* 1986; 56: 241-2.

- Thomas D.P. Pathogenesis of venous thrombosis. En: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD eds. Haemostasis and Thrombosis. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 1335-47.
- Thomas D.P., Barrowcliffe T.W., Curtis A.D. Low molecular weight heparin: A better drug?. Haemostasis 1986; 16: 87-92.
- Thomas D.P., Curtis A.D., Barrowcliffe T.W. A collaborative study designed to establish the 4th International Standard for Heparin. Thromb. Haemost. 1984; 52(2): 148-53.
- Thomas D.P., Merton R.E. A low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin. Thromb. Res. 1982; 28: 343-50.
- Thomas D.P., Merton R.E. and Barrowcliffe T.W. Relative efficacy of heparin and related glycosaminoglycans as antithrombotic drugs. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989b; 556: 313-22.
- Thomas D.P., Merton R.E., Barrowcliffe T.W., Thunberg L., Lindahl U. Effects of heparin oligosaccharides with high affinity for antithrombin III in experimental venous thrombosis. Thromb. Haemost. 1982; 47(3): 244-8.
- Thomas D.P., Merton, R.E., Gray E., Barrowcliffe T.W. The relative antithrombotic effectiveness of heparin, a low molecular weight heparin and a pentasaccharide fragment in an animal model. Thromb. Haemost. 1989a; 61: 204-7.
- Thomas D.P., Merton R.E., Lewis W.E., Barrowcliffe T.W. Studies in man and experimental animals of a low molecular weight heparin fraction.

Thromb. Haemost. 1981; 45: 214-8.

Thomson J.M., Poller L. The activated partial thromboplastin time. En: Thomson JM ed. Blood Coagulation and Haemostasis. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989; 301-39.

Tobølem G. Endothelial cell interactions with heparin. Semin. Thromb. Haemost. 1989; 15(2): 197-9.

Tolløfsen D.M., Blank M.K. Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. J. Clin. Invest. 1981; 68: 589-96.

Thunberg L., Bäckström G., Lindahl U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. Carbohydr. Res. 1982; 100: 393-410.

Van Dødem G., Nielsen J.I. Determinations of the molecular mass of low molecular mass (LMM) heparin. Pharmaeuropa 1991; 3: 202-18.

Vogel C.N., Kingdon H.S., Lundblad R.L. Correlation of *in vivo* and *in vitro* inhibition of thrombin by plasma inhibitors. J. Lab. Clin. Med. 1979; 93: 661-73.

Walenga J.M., Bara L., Samama M.M., Fareed J. Amidolytic antifactor Xa assays in the laboratory evaluation of heparin and low molecular weight fractions. Semin. Thromb. Haemost. 1985; 11: 100-7.

Walsh P.N., Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation. Br. J. Haematol. 1972; 22: 743-60.

- Waugh D.F., Fitzgerald M.A. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. *Am. J. Physiol.* 1956; 184: 627.
- Wessler S., Reimer S.M., Sheps M.C. Biologic assay of a thrombosis inducing activity in human serum. *J. Appl. Physiol.* 1959; 14 (6): 943-6.
- Wessler S. Thrombosis in the presence of vascular stasis. *Am. J. Med.* 1962; 33: 648-66.
- Yang X., Blajchman M.A., Craven S., Smith L.M., Anvari N., Ofosu F.A. Activation of factor V during intrinsic and extrinsic coagulation. Inhibition by heparin, hirudin and H-D-PHE-PRO-ARG-CH<sub>2</sub>Cl. *Biochem. J.* 1990; 272: 399-406.
- Yin E.T., Wessler S., Stoll P.J. Biological properties of the naturally occurring plasma inhibitor to activated Factor X. *J. Biol. Chem.* 1971a; 246: 3703-11.
- Yin E.T., Wessler S., Stoll P.J. Identity of plasma-activated factor X inhibitor with antithrombin III and heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 1971b; 246: 3712-9.
- Zur M., Nemerson Y. Kinetics of factor IX activation via the extrinsic pathway. Dependence of Km on tissue factor. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 5703-7.