

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 433**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 11/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2013 PCT/EP2013/075809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2013 E 13799608 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2929356**

54 Título: **Procedimiento para medir la coagulación de muestras de sangre utilizando pruebas viscoelásticas (VET)**

30 Prioridad:

06.12.2012 EP 12195804

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.07.2017

73 Titular/es:

**C A CASYSO AG (100.0%)
St. Jakobs-Strasse 17
4052 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**REDL, HEINZ;
ZIPPERLE, JOHANNES;
HOLNTHONER, WOLFGANG;
SCHLIMP, CHRISTOPH y
SCHÖCHL, HERBERT**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 622 433 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para medir la coagulación de muestras de sangre utilizando pruebas viscoelásticas (VET)

5 **[0001]** La invención se refiere a procedimientos que implican pruebas viscoelásticas (VET).

[0002] La hemostasia es un proceso fisiológico complejo de reclutamiento de una amplia gama de factores plasmáticos, células sanguíneas y endotelio. La comprensión clásica de una reacción en cascada a gran escala, impulsada por la cinética bioquímica y dependiente de sustratos aislados ha sido reemplazada por un modelo de coagulación basado en células. Después de su iniciación por células que expresan TF, como los fibroblastos, el proceso de coagulación se amplifica en la superficie de las plaquetas activadas y da lugar a una acumulación de proteasas activas y cofactores que finalmente producen la formación rápida de trombina y la generación de fibrina. El inicio, la dinámica y la descomposición de la coagulación dependen de la disponibilidad de los factores de coagulación en plasma, pero también están estrictamente regulados por mediadores derivados de células. Estudios recientes piden que se incluyan todos los componentes de la hemostasia en ensayos contemporáneos de coagulación: plasma, sangre y células endoteliales (Holcomb et al., Ann. Surg. 256 (2012): 476-486).

[0003] Las pruebas rutinarias de laboratorio que analizan el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) se realizan utilizando plasma en ausencia de células de la sangre, que han sido retiradas por centrifugación. A diferencia de las pruebas rutinarias de laboratorio, las pruebas viscoelásticas (VET), tales como la tromboelastometría por rotación (ROTEM) o la tromboelastografía (TEG) se pueden llevar a cabo con sangre completa, proporcionando una visión más completa del proceso de coagulación. Las VET son ampliamente utilizadas como herramienta de control del punto de atención para guiar terapias hemostáticas en el ámbito clínico (Ganter et al., Anesth. Analg. 106 (2008): 1366-1375).

[0004] La TEG/ROTEM ya proporciona parámetros de coagulación que implican el impacto de las células de la sangre, pero en las VET todavía no se han incluido mediadores pro- y anti-coagulantes derivados del endotelio circundante. Se sabe que las células endoteliales activadas facilitan la coagulación mediante la expresión de moléculas de adhesión, regulando por disminución las proteínas anti-trombóticas, mediante la expresión de pro-coagulantes y por la liberación de vesículas de membrana.

[0005] Sin embargo, además de los componentes de la sangre presentes en dichas VET clásicas (células de la sangre, plaquetas, componentes del plasma, factores de coagulación, moduladores de la coagulación, etc.) las células endoteliales también tienen una influencia relevante sobre la coagulación de la sangre. Ha habido varias demandas por los principales científicos en este campo para incluir el componente de células endoteliales en las VET (Holcomb et al., (2012); Johansson et al., Med. Hypoth. 75 (2010): 564-567); sin embargo, hasta la fecha, todavía no se ha podido investigar la influencia directa de las células endoteliales con las VET disponibles en la actualidad. Se ha investigado una influencia indirecta de las células endoteliales en VET por contacto de la sangre con las células endoteliales, eliminando las células endoteliales y midiendo después la coagulación de la sangre por TEG (Shankarraman et al., J. Biomed. Mater. Res. (B) 100B (2,012): 230-238); sin embargo, se pretendía que este ensayo pusiera a prueba la utilidad de usar TEG para estudiar la trombogenicidad de los biomateriales. Existe una necesidad continua de proporcionar dichas VET observando la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación de la sangre en el presente campo.

[0006] Amirkhosravi et al. (Throm. Res. 84 (1996): 323-332) describe la determinación de la actividad procoagulante de células tumorales mediante análisis SONOCLOT™ en sangre completa. Yu et al. (Adv. Healthc. Mat. 1 (2012): 199-213) informan acerca de la hemocompatibilidad dependiente de las estructuras de carbohidrato de cepillos de polímeros funcionales biomiméticos sobre la superficie.

[0007] Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento en el que las células endoteliales también se incorporen en VET.

[0008] Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para medir la coagulación de muestras de sangre o plasma usando pruebas viscoelásticas (VET) en el que la medición se realiza en presencia de células endoteliales inmovilizadas.

[0009] Con la presente invención, por primera vez es posible analizar la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación de la sangre en VET. En consecuencia, con la presente invención, se proporcionan nuevas VET que introducen superficies, especialmente microperlas, que llevan células endoteliales

para medir el impacto directo de las células endoteliales sobre la coagulación. Cuando se lleva a cabo el procedimiento con microperlas, las microperlas con las células endoteliales en su superficie se suspenden en la copa de medición del dispositivo de la prueba viscoelástica y se mezclan con la muestra de sangre o plasma. Con el presente procedimiento se hace posible que las células endoteliales formen parte del coágulo de sangre en formación analizado. Las células endoteliales añadidas preferentemente son adherentes a una superficie de colágeno, lo que representa una reproducción adecuada de la situación *in vivo*.

[0010] Las VET son conocidas desde hace un tiempo considerable, incluidos los dispositivos de VET apropiados para el control de la coagulación evaluando las propiedades viscoelásticas de la sangre. Las VET establecidas incluyen la TEG y la ROTEM con muchas variaciones disponibles para estos procedimientos (véase, por ejemplo Gantner et al., 2008). Las VET proporcionan información global sobre la dinámica del desarrollo, la estabilización y la disolución de los coágulos que se reflejan en la hemostasia *in vivo*. Las VET frecuentemente se utilizan como pruebas del punto de atención para controlar a los pacientes en cirugía (mayor compleja) o pacientes con traumatismos. Se ha demostrado que dicho control reduce significativamente el uso de terapia de componentes sanguíneos y la pérdida de sangre en general (véase, por ejemplo, Schöchl et al., Crit Care 14 (2010): R55).

[0011] Las VET típicas se llevan a cabo mediante la adición de sangre completa a una cubeta caliente a 37 °C. Dentro de la copa se suspende un pasador conectado a un sistema detector -este es un alambre de torsión en el caso de la TEG y un detector óptico en el caso del dispositivo de ROTEM. La copa y el pasador se mueven uno respecto a la otra en un ángulo de 4°45'. El movimiento se inicia desde la copa (TEG) o desde el pasador (ROTEM). A medida que la sangre coagula, se forman hebras de fibrina entre la copa y el pasador y la rotación de la copa se transmite al pasador en el caso de la TEG o impide la rotación del pasador en el caso de la ROTEM. Los patrones de cambio en la fuerza y la elasticidad en la coagulación de la sangre proporcionan información acerca de lo bien que la sangre puede realizar la hemostasia (la detención del flujo de sangre), y lo mucho o poco que diferentes factores contribuyen a la formación de coágulos.

[0012] Normalmente mediante esta prueba se determinan (al menos) cuatro valores que representan la formación del coágulo: el valor R (o tiempo de reacción), el valor K, el ángulo y la MA (amplitud máxima). El valor R representa el tiempo hasta que se detecta la primera evidencia de un coágulo. El valor K es el tiempo desde el final de R hasta que el coágulo llega a 20 mm y esto representa la velocidad de formación del coágulo. El ángulo es la tangente de la curva formada a medida que se alcanza K y ofrece información similar a K. La MA es un reflejo de la resistencia del coágulo. Se puede utilizar una fórmula matemática determinada por el fabricante para determinar un índice de coagulación (CI) (o evaluación general de la coagulabilidad) que tiene en cuenta la contribución relativa de cada uno de estos 4 valores en 1 ecuación. Aunque originalmente la TEG involucra sangre completa fresca no anticoagulada, tanto TEG como ROTEM comúnmente emplean sangre completa citrada que se vuelve a calcificar para iniciar la coagulación. También es común el uso de un activador, tal como el factor tisular (TF), ya que esto normaliza la prueba y además acelera la velocidad a la que ocurre la coagulación y por lo tanto la velocidad a la que se genera un resultado. Los dispositivos TEG y ROTEM tienen una serie de canales separados que permiten que se corran un número de muestras de forma simultánea o secuencialmente.

[0013] La tromboelastometría (TEM) también es un procedimiento viscoelástico establecido para pruebas de hemostasia en sangre completa. La TEM investiga la interacción de factores de coagulación, sus inhibidores, fármacos anticoagulantes, células sanguíneas, específicamente las plaquetas, durante la coagulación y la posterior fibrinólisis. Las condiciones reológicas imitan el flujo lento de la sangre en las venas. Mientras que la TEG tradicional es un ensayo global para trastornos de coagulación de la sangre y efectos de los fármacos, la TEM se usa principalmente en combinación con los ensayos diferenciales apropiados. Permiten analizar en presencia de concentraciones terapéuticas de heparina y proporcionan información de diagnóstico diferencial para apoyar las decisiones en terapia. La TEM detecta etapas tanto hipo como hiperfuncionales del proceso de coagulación y probablemente es la única prueba rápida fiable para el diagnóstico de hiperfibrinólisis. En contraste con las pruebas de coagulación convencionales, el efecto estabilizante de la fibrina del factor XIII contribuye al resultado. La rápida disponibilidad de los resultados ayuda a discriminar el sangrado quirúrgico de un verdadero trastorno de la hemostasia y mejora el tratamiento con productos sanguíneos, concentrados de factores, anticoagulantes y protamina, fármacos hemostáticos y antifibrinolíticos. En una TEM típica, la sangre (300 µl, anticoagulada con citrato) se pone en la cubeta desechable usando una pipeta electrónica. Un pasador desechable está unido a un eje que está conectado con un resorte delgado (el equivalente al cable de torsión de Hartert en la TEG) y oscila lentamente atrás y adelante. La señal del pasador en suspensión en la muestra de sangre se transmite a través de un sistema detector óptico. La prueba se inicia mediante la adición de los reactivos apropiados. El instrumento mide y muestra gráficamente los cambios en la elasticidad en todas las etapas de desarrollo y resolución del coágulo. La temperatura típica de la prueba en este caso también es de 37 °C, pero se pueden seleccionar temperaturas

diferentes, por ejemplo, para pacientes con hipotermia. En contraste con la TEG con su principio de tipo pendular, el diseño del sistema de detección viscoelástico de la TEM hace que sea muy robusto e insensible a choques o vibraciones mecánicas.

5 **[0014]** Las VET disponibles en el mercado, especialmente diversas formas de TEG y ROTEM se desvelan, por ejemplo, en Ganter et al., 2008. Normalmente, las muestras de sangre se activan extrínseca (factor tisular) y/o intrínsecamente (activador de contacto). Además, para determinar los niveles de fibrinógeno, las pruebas deben llevarse a cabo en presencia de un inhibidor de plaquetas (por ejemplo, citocalasina D en fib-TEM). Esta amplitud máxima/firmeza máxima modificada del coágulo (MA/MCF) representa entonces el coágulo de fibrina que se desarrolló sin la contribución de las plaquetas, es decir, el fibrinógeno funcional. Se ha demostrado que la MA/MCF de estas pruebas modificadas se correlaciona bien con el fibrinógeno evaluado por el procedimiento de Clauss ($r = 0,85$; TEG 5000 Manual de usuario y $r = 0,7511$). El procedimiento tradicional de Clauss, sin embargo, determina los niveles de fibrinógeno indirectamente: se añade un exceso de trombina a plasma diluido, se mide el tiempo hasta que se desarrolla un coágulo y se calcula el fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración. Aunque el procedimiento de Clauss se considera un ensayo patrón, se ha demostrado que la hemodilución con coloides puede interferir con estos ensayos, presentando niveles incorrectamente altos de fibrinógeno.

[0015] Las VET preferidas son TEG, ROTEM, ReoRox™ y SONOCLOT™, especialmente TEG y ROTEM. Las TEG preferidas son RapidTEG, TEG-Kaolin (con caolín como activador; para la evaluación de la coagulación general y de la función de las plaquetas), TEG-Heparinase (usando caolín y heparinasa para la detección específica de la heparina (es decir, una prueba de caolín modificado añadiendo heparinasa para inactivar la heparina presente), TEG-Platelet Mapping (ADP y ácido araquidónico para la función plaquetaria, controlando la terapia antiplaquetaria (aspirina, ADP, inhibidores de GPIIb/IIIa), y TEG-Native (sin activadores/inhibidores añadidos para un ensayo no activado; también se utiliza para realizar pruebas de hemostasia personalizadas). Las ROTEM preferidas son ex-TEM (con TF para el ensayo de la vía extrínseca; la evaluación rápida de la formación del coágulo y la fibrinolisis), in-TEM (con un activador de contacto para el ensayo de la vía intrínseca; evaluación de la formación de coágulos y polimerización de la fibrina), fib-TEM (con TF y un antagonista de plaquetas para la evaluación cualitativa de los niveles de fibrinógeno), ap-TEM (con TF y aprotinina para la evaluación de la vía fibrinolítica; detección rápida de la fibrinolisis cuando se usa junto con ex-TEM), Hep-TEM (con un activador de contacto y heparinasa para la detección específica de la heparina (prueba in-TEM modificada añadiendo heparinasa para inactivar la heparina presente), eca-TEM (con ecarina para la gestión de los inhibidores directos de la trombina (por ejemplo, hirudina, argatroban)), tif-TEM (con 1:1000 del TF para la vía extrínseca; controlando el factor VIIa recombinante activado), naTEM (sin inhibidores/activadores añadidos; ensayo no activado; también se utiliza para realizar pruebas de hemostasia personalizadas). Los ensayos Sonoclot preferidos son SonACT (con Celite para la gestión de grandes dosis de heparina sin aprotinina), kACT (con caolín para la gestión de grandes dosis de heparina con/sin aprotinina), aiACT (con Celite y arcilla para la gestión de grandes dosis de heparina con aprotinina (ACT insensible a la aprotinina)), gbACT (con perlas de vidrio para la evaluación global de la coagulación y de la función de las plaquetas), H-gbACT (con perlas de vidrio y heparinasa para la evaluación de la coagulación general y la función de las plaquetas en presencia de heparina; detección de heparina), microPT * (con 1:1000 del TF para la evaluación de la vía extrínseca; control del factor VIIa recombinante activado), Native (sin activadores/inhibidores añadidos; ensayo no activado; también se utiliza para realizar pruebas de hemostasia personalizadas).

[0016] Como ya se ha descrito anteriormente, la presente invención permite por primera vez el análisis de la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación de la sangre en VET. En Amirkhosravi et al., 1996, se añadieron células endoteliales en suspensión a sangre completa en una VET. Sin embargo, en esta configuración, se utilizaron estas células endoteliales como controles para células tumorales procoagulantes y no – como en la presente invención– como configuración para simular los tres componentes de la sangre en circulación – el plasma de la sangre, las células de la sangre y el contacto natural con el entorno– de células endoteliales inmovilizadas adherentes. Con la presente invención, por primera vez se ha creado un sistema de VET completo para simular estos tres elementos de la circulación de la sangre. La naturaleza revolucionaria de la presente invención también se refleja en el hecho de que el artículo correspondiente publicado posteriormente a la presente solicitud apareció publicado en una revista de hematología puntera en la bibliografía científica (Zipperle et al., Thromb. Haemost. 109 (2013): 869-877).

55 **[0017]** En contraste con las células endoteliales inmovilizadas de la presente invención, las células endoteliales añadidas en Amirkhosravi et al., 1996, (HUVECs) no tenían (y no estaba previsto que tuvieran) ningún efecto sobre la coagulación. Esto está en marcado contraste con las enseñanzas obtenidas con la presente invención con las células endoteliales inmovilizadas. Esta diferencia sorprendente obtenida entre Amirkhosravi et al., 1996, y la presente invención podría deberse al hecho de que las células endoteliales en su entorno fisiológico

forman la capa más interna (confluente) de un vaso sanguíneo y, por lo tanto, son células naturalmente adherentes (Gimbrone et al., J. Cell. Biol. 60 (1974): 673-684). Para imitar esta confluencia, se desarrolló el procedimiento de acuerdo con la presente invención con células inmovilizadas adherentes a las superficies, especialmente microperlas. Las superficies, especialmente las microperlas, permiten un recubrimiento fisiológico y permiten estudiar las células endoteliales de una manera mucho más apropiada y prácticamente relevante, porque la coagulación de la sangre se imita de forma mucho más próxima. Además del hecho de que para el estudio de células adherentes estas células tienen que mantenerse de manera adherente, solo el procedimiento de acuerdo con la presente invención ha demostrado permitir resultados técnicamente reproducibles, ya que las células inmovilizadas se pueden utilizar inmediatamente y durante un período más largo en contraste con una suspensión celular libre (tal como se aplica por Amirkhosravi et al., 1996), que se tiene que preparar especialmente para cada medición mediante el tratamiento de las células con enzimas (tripsina), el posterior lavado, recuento y resuspensión. Esto no solo es laborioso, sino que tampoco es un sistema estable, ya que las células adherentes en el sistema de Amirkhosravi et al., 1996 se adherirán a las superficies de plástico a las pocas horas y no puede lograrse un número estable de células. Esto está en contraste con la presente invención en la que las células endoteliales se inmovilizan sobre superficies (por ejemplo, perlas), que se pueden mantener durante varios días/semanas con el número de células relativamente estable y la posibilidad de un uso inmediato. Los inconvenientes de la utilización de las células endoteliales en VET de ese modo se han eludido elegantemente con el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Además, el uso de estas células para imitar más estrechamente la coagulación *in vivo* de la sangre nunca se ha contemplado en la técnica anterior, y por supuesto no en Amirkhosravi et al., 1996 (de hecho, en este documento tenían un objetivo completamente diferente).

[0018] De cualquier manera, es esencial que las células endoteliales ya se hayan proporcionado en forma inmovilizada para la VET de acuerdo con la presente invención; por tanto, es claro que el uso de microperlas recubiertas no por células o recubiertas de sustancias (por ejemplo, para superficies recubiertas no por células) no es adecuado para el procedimiento de acuerdo con la presente invención (las microperlas no recubiertas tienen efectos secundarios en el sistema de acuerdo con la presente invención y solamente se utilizan como controles en blanco).

[0019] Preferentemente, las células endoteliales se inmovilizan sobre microperlas, preferentemente sobre microperlas de dextrano.

[0020] Hay varios tipos de microportadores celulares, mayoritariamente para aplicaciones de biorreactores. La geometría esférica proporciona una superficie favorable en relación al volumen y permite el pipeteado, así como una mejor dispersión de los vehículos dentro de contenedores de cultivo de células móviles. Los materiales básicos para la fabricación de microportadores incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, acrilamida, gelatina porcina, dextrano, etc. Los biopolímeros como el dextrano se pueden reticular químicamente a otras moléculas orgánicas grandes como el colágeno y, por lo tanto, son ventajosos para simular la adherencia de las células a una lámina basal. En este sentido, los biomateriales recubiertos con colágeno se ha demostrado que poseen una trombogenicidad relativamente baja cuando se exponen a la sangre (Shankarraman et al., J. Biomed. Mater. Res. (B) 100B (2012): 230-238). Las microperlas son partículas de polímero uniformes de 0,1 a 1000, preferentemente de 0,5 a 500 micrómetros de diámetro. Se pueden sembrar células endoteliales en su superficie, y se utilizan de acuerdo con la presente invención. En una realización, las microperlas descritas pueden ser microperlas con forma irregular o microperlas con forma regular. Las microperlas también pueden tener una forma seleccionada del grupo que consiste en microesferas, microcápsulas, microcilindros, microcubos y microtubos. Más preferentemente, dichas microperlas son microesferas. Si se desea una gran área superficial, las microperlas también pueden ser porosas. Preferentemente, las microperlas están fabricadas de más de un material, por ejemplo mezclas de dos, tres o más materiales diferentes, especialmente de los materiales mencionados anteriormente. Aún más preferidas son las microperlas que están recubiertas, por ejemplo, de dextrano o dextranos reticulados que están recubiertos con fibronectina, albúmina, polilisina o polímeros naturales, como el colágeno, la fibrina, el alginato, el quitosano, la gelatina, etc. La unión de las células endoteliales a las microperlas se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica para las células de unión a superficies sólidas, especialmente las microperlas. Preferentemente, la superficie es "atractora" para las células endoteliales para que las células endoteliales se adhieran a esta superficie, por ejemplo, por la unión de la integrina.

[0021] Aunque en principio se pueden utilizar todos los tipos de células endoteliales en el procedimiento de acuerdo con la presente invención (más específicamente: células endoteliales microvasculares o macrovasculares), las células endoteliales preferidas utilizadas en el presente procedimiento son células endoteliales en crecimiento (OECO), células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), células dérmicas endoteliales microvasculares humanas (HDMEC; como modelo para las células endoteliales microvasculares) o células endoteliales de la vena

safena humana (HSVECs; como modelo para las células endoteliales macrovasculares).

- [0022]** Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza con sangre y las células obtenidas a partir del mismo donante (entorno autólogo). Sin embargo esto no es obligatorio ya que las HUVEC y las OECO agrupadas tuvieron el mismo efecto sobre los parámetros viscoelásticos. Esto demuestra que se pueden sembrar varios tipos de células endoteliales en microperlas para incluir la porción endotelial de la hemostasia en las VET. Cuando se proporcionan en condiciones que permiten el transporte de células vivas (es decir, ultracongeladas), las perlas recubiertas de endotelio se pueden proporcionar convenientemente como un kit de prueba.
- [0023]** La presente invención se centra en el impacto directo de las células endoteliales en las VET. Con la presente invención se introduce y se valida un nuevo procedimiento para incluir EC adherentes en VET, especialmente en pruebas de tromboelastometría, para evaluar su impacto sobre los parámetros de coagulación.
- [0024]** De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende un dispositivo para realizar pruebas viscoelásticas (VET) y células endoteliales inmovilizadas, especialmente para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, el kit de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos elementos distintos, el dispositivo para la realización de las VET y las células endoteliales inmovilizadas. Además, tampoco es posible inmovilizar las células endoteliales, por ejemplo en las copas de medición de ROTEM o TEG, debido a que el principio de medición es la formación de fibras de fibrina entre dos superficies rugosas y la inmovilización de las células endoteliales en la pared de la copa impediría este contacto, no se podría medir ninguna señal de este tipo. Este kit permite por primera vez a una simulación que funciona diligentemente para los procesos de coagulación de la sangre *in vivo*.
- [0025]** El dispositivo para la realización de pruebas viscoelásticas (VET) puede ser cualquier dispositivo que se utilice para las VET conocidas; prácticamente se pueden utilizar todos los dispositivos de VET (especialmente los preferidos descritos anteriormente) con las células endoteliales inmovilizadas de acuerdo con la presente invención.
- [0026]** La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos y las figuras, sin embargo, sin estar restringida a ellos.

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo de trabajo esquemático de la preparación de perlas y el procedimiento de medición.

- La Figura 2 muestra una suspensión de microperlas en EGM-2. A: OEC no recubiertas; B: OEC recubiertas. Barra de escala = 200 μm . C: imagen SEM de perlas recubiertas con OEC (falta la escala de las barras); D: magnificación de C. Barra de escala = 10 μm . E Incorporación de microperlas no recubiertas a un coágulo de sangre completa derivada de una copa ROTEM. F: Sección ampliada de E. Barra de escala = 200 μm .

- La Figura 3 muestra (A) la reducción del CT mediante el aumento de los volúmenes de suspensión de perlas no recubiertas o de perlas recubiertas con OEC, con (+TNF- α) o sin preincubación con TNF- α durante toda la noche. (B) resultados con el aumento de los volúmenes de la suspensión de perlas recubiertas con HUVEC con (+TNF- α) o sin incubación con TNF- α durante toda la noche. Los valores individuales se muestran como porcentaje negativo de un vehículo de control medido simultáneamente. Las barras de error representan la media \pm SD. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

- La Figura 4 muestra el impacto de perlas desnudas, con recubrimiento de colágeno y TNF- α sobre el CT. La sangre se combinó con 50 μl de perlas Cytodex 1 (sin recubrir) y perlas Cytodex 3 recubiertas con colágeno con preincubación opcional con TNF- α (+TNF- α) durante toda la noche. Las barras de error representan la media \pm SD. (ns = no significativo).

- La Figura 5 muestra (A) el impacto de mediadores procoagulantes liberados en el fluido sobrenadante de suspensiones de perlas tras la estimulación. Los sobrenadantes (SN) se recogieron de suspensiones de perlas recubiertas con OEC o HUVEC que opcionalmente se habían preincubado con TNF- α (+TNF- α). (B) Inhibición del TF en sobrenadantes de suspensión de perlas. La sangre se combinó con 50 μl de medio no acondicionado (CTRL) o fluido sobrenadante de perlas recubiertas sin estimular (unstim) o con OEC y HUVEC preincubadas con TNF- α (+TNF- α). Opcionalmente, los sobrenadantes se incubaron con un anticuerpo inhibidor contra el TF humano (+AntiTF). Si no se indica lo contrario, las mediciones se comparan con CTRL. Las barras de error representan la media \pm SD. (ns = no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

EJEMPLOS:

Materiales y procedimientos

Cultivo de células

[0027] El estudio fue aprobado por el comité de ética local de la AUVA y se realizó de acuerdo a las normas de buena práctica clínica. A fin de permitir un futuro entorno autólogo (células endoteliales y sangre obtenida del mismo donante) en los presentes experimentos se hace referencia a OEC, pero los hallazgos se corroboraron con HUVEC, un modelo endotelial bien caracterizado. Con referencia a un protocolo bien establecido, las OEC se derivan de células progenitoras endoteliales (EPC), un pequeño subconjunto de células mononucleares (MNC) presentes en la sangre periférica (Fuchs et al., *Biomaterials* 27 (2006): 5399-5408). Las muestras de sangre para el aislamiento de MNC se obtuvieron de donantes sanos después de dar su consentimiento informado por escrito. Las OEC se cultivaron en medio de crecimiento endotelial-2 (EGM-2, Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.) y se identificaron por su morfología, por qPCR y citometría de flujo. Los fenotipos endoteliales de las OEC incluidas en el ensayo de coagulación de acuerdo con la presente invención se confirmaron evaluando los patrones de expresión de los marcadores endoteliales CD31, VE-cadherina y VEGFR-2 como se describe en otra parte (Holthöner et al. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2012): DOI: 10.1002/term). Para confirmar los resultados actuales con un modelo endotelial bien establecido, los experimentos se repitieron con microperlas recubiertas con HUVEC. Las HUVEC se adquirieron de Lonza (Walkersville, Md, EE.UU.) y se cultivaron en EGM-2.

[0028] Para sembrar las células endoteliales en microperlas, se mezcló un recuento de células aproximado de 400 OEC o HUVEC por perla con perlas Cytodex 3 (recubiertas con colágeno) microportadoras de dextrano (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) en 1 ml de medio EGM-2. Las perlas y las células se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO₂ durante 4 h y se agitaron suavemente cada 20 min. Después de transferir la suspensión a un matraz de cultivo tisular de 25 cm² (Greiner Bio-One, Linz, Austria), las microperlas se incubaron opcionalmente con TNF- α (Sigma Aldrich, Viena) a una concentración final de 10 ng/ml durante 12-16 h a 37 °C y el 5 % de CO₂ en 4 ml de EGM-2 para simular una situación inflamatoria. Para evaluar la influencia del colágeno, se compararon los datos de perlas Cytodex 3 desnudas recubiertas con colágeno con perlas Cytodex 1 sin revestir en un entorno idéntico (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

Preparación de sobrenadante del cultivo y suspensiones de perlas

[0029] Se tomaron suavemente perlas recubiertas y sobrenadante de cultivo celular acondicionado durante toda la noche con una pipeta serológica de 10 ml y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml. Una vez que las perlas descienden, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a tubos de 1,5 ml y se centrifugó a 1500 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se congelaron inmediatamente a -80 °C para su análisis posterior mientras que al menos 200 μ l que quedan en los tubos se descartan para evitar la contaminación con células enteras y restos celulares. Las perlas se resuspendieron con EGM-2 fresco precalentado (37 °C) apoyando suavemente contra la pared del tubo. Una vez más, después de la sedimentación se descartó el sobrenadante. Para eliminar las células no adherentes y los restos celulares, esta etapa se repitió tres veces con PBS precalentado. A fin de lograr una relación volumétrica 1:1 de perlas a medio en suspensiones de perlas, se añadieron 5 ml de EGM-2 y se igualó al volumen de perlas empaquetado por aspiración. Las suspensiones de perlas sirvieron como solución madre para la dilución subsiguiente, se mantuvieron en un bloque de calentamiento a 37 °C a lo largo de todos los experimentos y se procesaron en menos de 3 horas. En la Figura 1 se da un diagrama de flujo de trabajo esquemático del procedimiento.

45 ROTEM

[0030] La ROTEM (TEM Innovation, Múnich, Alemania) utiliza un pasador rotativo que se sumerge verticalmente en una copa precalentada que contiene la muestra de sangre y se puede realizar simultáneamente en cuatro canales dentro del mismo dispositivo. La coagulación de la muestra de sangre, por lo general citrada, se inicia mediante recalcificación y es detectable a medida que la formación del coágulo de fibrina entre el pasador y la pared de la copa reduce el rango de rotación del pasador. La señal generada se convierte en una curva que da una indicación para el punto de iniciación de la coagulación, la calidad de los factores que intervienen y el inicio de la fibrinólisis.

[0031] Después de obtener el consentimiento informado escrito de un voluntario sano, sin antecedentes de coagulopatía y/o terapia anticoagulante/antiplaquetaria, su sangre se extrajo usando estasis mínima de una vena antecubital mediante una aguja del calibre 21. Después de descartar los primeros 3 ml, la sangre se recogió en tubos de 3,5 ml (Vacuette; Greiner Bio-One, Linz, Austria) que contienen 0,3 ml tamponados con el 3,2 % de citrato trisódico. Las muestras se mantuvieron en una fase de precalentamiento a 37 °C durante al menos 10 minutos antes

del análisis y se procesaron en menos de 3 horas. El análisis ROTEM de la muestra WB se inició por recalcificación con la adición de 20 μ l de CaCl_2 (star-TEM[®], 200 mmol/l) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 **[0032]** Se añadieron suspensiones de microperlas o sobrenadantes directamente a la copa inmediatamente después de la recalcificación de la sangre citrada y se mezclaron pipeteando suavemente arriba y abajo. El volumen de reacción final por copa de ROTEM era de 370 μ l, que consta de 300 μ l de sangre completa citrada, 20 μ l de CaCl_2 y 50 μ l de suspensión de perlas/sobrenadante. Para evaluar los cambios dependientes de la concentración en parámetros de la TEM se diluyeron 0, 5, 20 y 50 μ l de la solución madre original, con EGM-2 hasta el volumen de reacción final de 50 μ l.

10

[0033] Los siguientes parámetros de la ROTEM se calcularon a partir de la señal y se incluyen en el análisis estadístico: El tiempo de coagulación (CT, s), la latencia hasta que el coágulo alcanza una firmeza de 2 mm; la medida para la trombina inicial y la formación de fibrina. El tiempo de formación de coágulo (CFT, s), el tiempo del CT hasta que el coágulo alcanza una firmeza de 20 mm indica la calidad de la función de las plaquetas y del fibrinógeno. Ángulo alfa (α , °), el ángulo entre el eje x y la tangente de la curva que se forma a partir del punto CT; comparable con CFT. Firmeza máxima del coágulo (MCF, mm), amplitud máxima de la curva; indica la fuerza absoluta del coágulo. A30 (mm), la firmeza del coágulo después de 30 minutos.

Inhibición de la actividad del factor tisular

20

[0034] Para evaluar el impacto de mediadores solubles endoteliales se añadió un volumen igual de sobrenadante de cultivo celular, diluido con EGM-2, a las pruebas NATEM.

25 **[0035]** El medio acondicionado se recogió a partir de cultivos de microperlas estimulados con TNF- α durante toda la noche y sin estimular y se procesó como se ha señalado antes. Para examinar el supuesto impacto del TF derivado del endotelio los sobrenadantes de cultivo se preincubaron con un anticuerpo inhibidor para los aminoácidos 1-25 dentro del dominio extracelular del factor tisular (TF de ratón dirigido contra humano de American Diagnostica, 0,5 mg/ml, ADG4509, clon IIID8). Experimentos previos han demostrado que este anticuerpo podía rescatar la reducción del CT de sangre completa en presencia del TF extrínseco (Nielsen et al., *Anaesth. Analg.* 104 (2007): 59-64). El anticuerpo se emplea con movimiento suave a una dilución de 1:50 durante 1 hora a 37 °C en un agitador de rotación personalizado.

30

Microscopía

35 **[0036]** Antes y después del análisis ROTEM, se examinaron alícuotas de la solución madre para la adherencia y la cantidad de células endoteliales por microscopía de contraste de fase (Zeiss).

40 **[0037]** Las copas se retiraron del dispositivo después de que se generó A30 y se fijaron con formalina tamponada al 4 % a 4 °C. Después de una etapa de lavado con PBS el coágulo de sangre junto con el pasador se extrajo suavemente de la copa y se deshidrataron en una serie graduada de alcohol. Las muestras se secaron químicamente con hexametildisilazano, se montaron en tacos, se recubrieron por bombardeo iónico con oro y paladio y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM, Jeol JSM-6510).

Análisis estadístico

45

[0038] Dado que se informa que los valores de referencia para los parámetros de tromboelastometría no activada (NATEM) son objeto de una fuerte variación, el Tiempo de coagulación (CT), el Tiempo de formación del coágulo (CFT), la Firmeza máxima del coágulo (MCF), el ángulo alfa (α) y A30 se convirtieron al porcentaje del vehículo de control respectivo, medido de forma simultánea. Los datos se incluyeron en una hoja de datos de Excel, se analizaron con el *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) y se indican como la media \pm desviación típica. Basado en una prueba de Kolomorogov-Smirnov se determinó que los datos no estaban distribuidos normalmente. Por lo tanto, se aplicó una prueba de Mann-Whitney para comparar los valores de los volúmenes de suspensión correspondiente (5, 20, 50 μ l) en los respectivos grupos (desnudo frente a recubiertos con células, no estimulado frente a estimulado). Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

55

Resultados

Incorporación de las células endoteliales en ROTEM

[0039] Células endoteliales adherentes se pueden transferir como una suspensión y por lo tanto se pueden incluir en una ROTEM (Figura 2A-D). Efectivamente, la evaluación microscópica de contraste de fase de las soluciones madre antes y después de la tromboelastometría indicaban una incorporación de células endoteliales adherentes en el coágulo a lo largo de las pruebas viscoelásticas. El análisis posterior de las imágenes del microscópico electrónico de barrido (SEM) de coágulos de sangre de las copas de TEM también confirmó una distribución uniforme de las perlas dentro de las muestras de sangre coagulada. Visualmente no hubo diferencias en la dispersión de las perlas recubiertas de células o desnudas (Fig. 2E, F).

Impacto de las células endoteliales sobre ROTEM

10

[0040] La inclusión de perlas recubiertas con células endoteliales en el análisis ROTEM redujo significativamente el CT de una manera dependiente de la dosis (Fig. 3 A). Usando diferentes volúmenes de suspensiones de microperlas (5, 20, 50 μ l) no solo se acortó el CT con células activadas, sino también con las células que no habían sido estimuladas con TNF- α . La adición de los volúmenes de suspensión de perlas recubiertas con células no estimuladas acorta significativamente el CT en comparación con un volumen igual de controles no recubiertos. La activación previa de células por incubación con TNF- α resultó en un acortamiento significativo adicional del CT. Para confirmar los presentes hallazgos con EC derivadas de otro tejido, estos experimentos se repitieron con microperlas recubiertas con HUVEC. El aumento de los volúmenes de la suspensión de perlas recubiertas con HUVEC dio lugar a un acortamiento similar del CT (Fig. 3 B). Una vez más, esta mejora de la iniciación de la coagulación era detectable tanto con células estimuladas con TNF- α como con células no estimuladas.

[0041] Suspensiones de perlas desnudas opcionalmente preincubadas con TNF- α sirvieron como control y el CT se acortó en menor medida. En contraste con efectos significativos sobre la iniciación de la coagulación, los parámetros de la formación del coágulo no se alteran en presencia de endotelio. Los parámetros de la ROTEM del Tiempo de formación del coágulo (CFT), Firmeza máxima del coágulo (MCF) y α -ángulo (α) no mostraron ningún efecto de los mediadores derivados del endotelio sobre la dinámica de la coagulación y la resistencia del coágulo.

[0042] Además, no se pudo confirmar la activación esperada de la coagulación por el colágeno de la superficie de las perlas Cytodex 3 empleadas. En realidad, la comparación de los resultados de perlas Cytodex 1 no recubiertas y Cytodex 3 recubiertas con colágeno no mostró ningún efecto del recubrimiento del colágeno en la iniciación de la coagulación en la prueba de NATEM (Fig.4).

Impacto de los mediadores endoteliales solubles

35

[0043] Para analizar indirectamente si la reducción del CT también estaba asociada a la liberación endotelial de mediadores procoagulantes en su entorno se recogió medio acondicionado a partir de cultivos de EC y se añadieron a la copa ROTEM en volúmenes cada vez mayores. Los cultivos de EC opcionalmente se habían incubado con TNF- α durante toda la noche. La adición de 5, 20 o 50 μ l de sobrenadantes de cultivo de células cosechadas de la suspensión de perlas de OEC y HUVEC reduce el CT de manera similar al de un volumen equivalente de perlas microportadoras recubiertas por células. Una vez más, una incubación previa de las células con TNF- α dio como resultado un acortamiento significativo del CT en comparación con sobrenadantes derivados de los controles no tratados (Fig. 5 A).

45 Inhibición del factor tisular

[0044] Puesto que se supuso que la reducción del CT tanto con perlas recubiertas con EC como con medio acondicionado con EC estaba asociada a la mayor disponibilidad del TF basado en células y soluble, se intentó restablecer los CT normales inhibiendo específicamente la actividad del TF.

50

[0045] Por lo tanto, suspensiones de perlas y los sobrenadantes de cultivo de células se incubaron con un anticuerpo inhibidor contra el dominio extracelular del TF humano.

[0046] La preincubación de suspensiones de perlas con el anticuerpo dirigido contra el TF rescató al menos parcialmente el acortamiento observado del CT (Fig. 5 B).

[0047] Cuando se incubaba con la inhibición del anticuerpo antes de las mediciones tromboelastométricas, 50 μ l de sobrenadante de los cultivos de OEC y HUVEC casi llegaron a la capacidad de coagulación de un volumen igual de medio no acondicionado, que se denomina control.

Discusión

- [0048]** De acuerdo con la presente invención se estableció con éxito un sistema de prueba que incluye los tres componentes de la coagulación –el plasma, las células de la sangre y el endotelio. Los hallazgos de la presente invención demuestran 1) que las EC se pueden incorporar con eficacia en un ensayo de ROTEM a través de microperlas recubiertas de colágeno, 2) una aceleración de la coagulación por EC activadas y no activadas, así como 3) una liberación endotelial de procoagulante, componentes que llevan el TF en su entorno.
- 10 **[0049]** El uso de perlas de Cytodex™ como microportadores para células endoteliales adherentes a una matriz de colágeno, esferas con una superficie parecida a la pared de un recipiente se incorporaron en un ensayo de coagulación *ex vivo* basado en ROTEM con la facilidad de operabilidad y reproducibilidad. Las perlas de Cytodex™ han demostrado ser útiles como microportadores para células adherentes y se han utilizado en una variedad de aplicaciones de cultivo celular, incluyendo los estudios de angiogénesis *in vitro*.
- 15 **[0050]** Dado que los microportadores aplicados se recubrieron con colágeno I, se consideró un efecto potencial sobre el CT incluso en experimentos que incluyen perlas sin EC. El colágeno, como parte de la matriz subendotelial, tiene un potencial altamente pro-trombogénico cuando se expone a la sangre que fluye. Tras la lesión, las plaquetas circulantes se adhieren firmemente al colágeno fibrilar a través del receptor de la glucoproteína IIb-IIIa a bajas velocidades de cizallamiento. En vista de este hecho, se sugirió la unión acelerada de las plaquetas a la superficie de colágeno de las perlas que posiblemente podría dar lugar a una reducción del CFT. Sin embargo, las mediciones de iniciación de la coagulación con perlas recubiertas con colágeno no difirieron significativamente de las perlas Cytodex 1 no recubiertas. Las perlas Cytodex 3 están provistas de una fina capa de colágeno desnaturalizado, que está químicamente reticulado al dextrano. Según el fabricante esta capa de colágeno es susceptible a la digestión enzimática con tripsina y colagenasas. A este respecto, la matriz proporcionada parece ofrecer una superficie adecuada para la adhesión celular pero no parece que transmita la agregación de las plaquetas mediada por glicoproteínas bajo tensión de cizallamiento.
- 20 **[0051]** En un estudio reciente se evaluó el potencial trombogénico de sangre incubada previamente con células endoteliales sobre diferentes proteínas de la matriz por TEG, pero las células no estaban presentes durante las mediciones de la coagulación. Los valores del CT de sangre con HUVEC que habían sido cultivadas en colágeno I fueron considerablemente más altos que los medidos con las células en las superficies compuestas de otra manera.
- 35 **[0052]** De forma similar, se pudo descartar la influencia de posibles trazas de TNF- α que no hubiese sido eliminado por las etapas de enjuague durante el procesamiento de suspensiones de perlas. De hecho, el medio acondicionado para los experimentos con sobrenadante todavía contenía la concentración final de TNF- α para la estimulación de las células endoteliales. El TNF- α es un mediador importante en la señalización inflamatoria en numerosos tipos de células tales como macrófagos y podría afectar a la coagulación de sangre completa que se asemeja a la incubación de lipopolisacárido. Sin embargo, es poco probable que el TNF- α restante en las suspensiones pudiera inducir una reacción fisiológica en el período de tiempo relativamente corto de la medición del tiempo de coagulación tromboelastométrica desde que se añaden a la sangre justo antes del análisis.
- 40 **[0053]** Con el procedimiento de acuerdo con la presente invención las células endoteliales activadas y en reposo se incluyeron en un ensayo de ROTEM para rastrear su impacto sobre los parámetros de coagulación. En contraste con las expectativas razonables, que sugieren un efecto anti-coagulante del endotelio en reposo en ensayos de coagulación, el CT se acortó incluso en presencia de células endoteliales quiescentes. La reducción del CT observada se mejoró eminentemente después de la incubación previa de células con TNF- α . Considerando que se aceleró la iniciación de la coagulación de la sangre (CT), los parámetros de la dinámica de la coagulación (CFT, α) y de la resistencia del coágulo (MCF, A30) permanecieron intactos. La activación de la coagulación por un aumento de la disponibilidad del TF no afecta a la resistencia del coágulo y a la dinámica de la polimerización. En un estudio de tromboelastometría reciente, se ha demostrado que la activación extrínseca con el TF acorta el CT que dejan a otros parámetros de VET inalterados.
- 50 **[0054]** Dos tipos diferentes de células endoteliales, OEC y HUVEC, que eran ambas adherentes a una superficie de colágeno, modificaron significativamente la aparición de la coagulación. Dado que no se esperaba que las OEC quiescentes activasen la coagulación, los presentes experimentos se repitieron con HUVEC a fin de reproducir los resultados obtenidos en un modelo endotelial bien caracterizado. Ambos tipos de células respondieron a la activación con TNF- α y a la reducción más exagerada del CT. Los presentes resultados no solo sugieren el

cambio de las células a un fenotipo pro-trombótico, sino también una liberación de mediadores pro-coagulantes en el medio circundante como respuesta a la activación. Este patrón pro-coagulante todavía estaba presente después del aclarado y la sustitución del medio. Además, las propiedades pro-trombóticas del sobrenadante no se vieron perjudicadas por la centrifugación.

5

[0055] Por lo tanto se supuso que la exposición de las células a TNF- α induce un potente activador de la coagulación, que estaba presente en una forma de base celular y una forma soluble. El TF, que se produce en las membranas celulares, en la superficie de vesículas de membrana hundida y en una isoforma soluble se ha demostrado que abrevia el tiempo de coagulación en TEG. En la técnica anterior ya se ha informado de una restauración del acortamiento inducido por el TF del CT por preincubación de la muestra de sangre con un anticuerpo dirigido contra el TF inhibidor. En los presentes ejemplos, los valores del CT fueron restaurados por el bloqueo del TF en el medio acondicionado con el mismo anticuerpo. Varios tipos de células endoteliales regulan al alza la expresión del TF en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, la tensión de cizallamiento y la exposición al flujo.

10
15

[0056] Sin embargo, en HUVEC no tratadas, la expresión del TF por lo general cesa a un nivel indetectable con otros medios de crecimiento utilizados en este estudio. En vista de que las propiedades procoagulantes de OEC y HUVEC se observaron incluso en un estado no estimulado, se sugieren la expresión constitutiva débil del TF que probablemente surgió del procedimiento de cultivo. La expresión del TF basal podría estar impulsada por la estimulación por diversos factores de crecimiento como el FGF2 y el VEGF en el medio completo EGM-2 que se utilizó en todos los experimentos.

20

[0057] En contraste con la mayoría de los subtipos endoteliales *in vivo*, el TF se expresa en la superficie de las células endoteliales cultivadas como una reacción a citoquinas inflamatorias. *In vivo*, la expresión del TF solo se podía demostrar en condiciones sépticas con el flujo sanguíneo perturbado y junto con tipos de tumores específicos. De hecho, el análisis viscoelástico de la sangre completa, estimulada con lipopolisacáridos (LPS) tanto *in vitro* como *in vivo* reveló una activación de la coagulación de la sangre, lo que sugiere una mayor disponibilidad del TF, probablemente procedente de monocitos.

25

[0058] Además, varios estudios confirmaron el TF en micropartículas derivadas de endotelio *in vitro*, pero su presencia en micropartículas generadas *in vivo* y su papel real en la patogénesis del cáncer, la trombosis y la endotoxemia todavía es objeto de investigación intensiva. En la coagulación intravascular diseminada, el endotelio activado también proporciona el microambiente protrombótico que finalmente produce la coagulopatía de consumo y la alteración de la microcirculación.

30
35

[0059] Los primeros estudios sobre la trombosis inducida por endotoxemia sugirieron la activación de la trombina por el FXI, el FXII, y la calicreína plasmática. En este caso, el efecto pro-coagulante de un estado inflamatorio en sangre completa se asoció con el TF derivado del endotelio. El aumento de la disponibilidad del factor tisular se ha demostrado que acorta el CT *in vitro*. El TF es detectable en células endoteliales cultivadas tratadas con citoquinas inflamatorias, en micro-vesículas liberadas de la superficie del endotelio, monocitos y plaquetas y se ha detectado en una forma soluble en sobrenadantes de cultivo. A pesar de que todavía es imposible determinar la localización del TF en la configuración experimental de acuerdo con la presente invención, se puede demostrar que es funcional y que activa la coagulación. Aunque el TF, como activador primario de la coagulación, se expresa en la respuesta endotelial y leucocitaria a las citoquinas inflamatorias como la IL-1 o el TNF- α , su papel en las respuestas inflamatorias sistémicas de la coagulación todavía está en discusión. Los estudios *in vitro* revelan la expresión del TF y la liberación de micropartículas en HUVEC tras la activación pero estos datos parecen difíciles de aplicar a la función endotelial durante la hemostasia en estado sano y enfermo.

40
45

[0060] Sin embargo, la interacción directa del endotelio con la coagulación de la sangre es difícil de evaluar ya que depende de los datos de los modelos de flujo de cultivos de células o incluye técnicas de imagen elaboradas *in vivo*. Los sistemas de flujo y ensayos de coagulación *in vitro* comunes con el fin de combinar los mediadores endoteliales y los componentes de la sangre por lo general se basan en las pruebas rutinarias de laboratorio. Puesto que no había interés en la capacidad del endotelio para interferir directamente con la iniciación de la coagulación, los microportadores que comprenden las células endoteliales se incorporaron en el nuevo ensayo de acuerdo con la presente invención que fue capaz de detectar el inicio de la coagulación de sangre completa. El enfoque de acuerdo con la presente invención con perlas recubiertas con endotelio en sangre completa proporcionó resultados altamente reproducibles en relación con la iniciación de la coagulación en condiciones inflamatorias simuladas.

50
55

Conclusiones

[0061] Con la presente invención se proporciona un nuevo ensayo viscoelástico introduciendo microperlas que llevan EC en TEM, especialmente ROTEM, con facilidad en cuanto a su operabilidad y reproducibilidad. Impulsado por el pasador de rotación del dispositivo ROTEM, se distribuyeron homogéneamente microperlas dentro de la muestra de sangre, exponiendo probablemente las células endoteliales a bajas fuerzas de cizallamiento.

[0062] Mediante la introducción de EC en la VET, fue posible rastrear un mecanismo celular de hemostasia subyacente en condiciones fisiológicas y patológicas, es decir, una reducción del CT en sangre completa. Los resultados de acuerdo con la presente invención muestran una activación directa de la coagulación por EC sobre microperlas, especialmente cuando se activa con TNF- α . Por otra parte, existe una fuerte evidencia de la liberación de componentes que llevan TF al entorno celular.

ABREVIATURAS

15 **[0063]**

- EC = Células endoteliales
- A30 = Firmeza del coágulo después de 30 minutos
- CT = Tiempo de coagulación
- 20 CFT = Tiempo de formación del coágulo
- DIC = Coagulación intravascular diseminada
- EGM-2 = Medio de crecimiento endotelial 2
- HUVEC = Células endoteliales de vena umbilical humana
- MCF = Firmeza máxima del coágulo
- 25 NATEM = Tromboelastometría no activada
- OEC = células endoteliales de crecimiento
- PBS = Tampón fosfato salino
- qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- SEM = Microscopía electrónica de barrido
- 30 TEM = Tromboelastometría
- TF = Factor tisular
- vWF = Factor de van Willebrand
- WB = Sangre completa
- VEGF = Factor de crecimiento vascular endotelial
- 35 VET = Prueba viscoelástica
- FGF2 = Factor de crecimiento de fibroblastos 2
- FI-XIII = Factores de coagulación I-XIII

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para medir la coagulación de muestras de sangre o plasma usando pruebas viscoelásticas (VET) en el que la medición se realiza en presencia de células endoteliales inmovilizadas.
5
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la VET es tromboelastometría por rotación (ROTEM) o tromboelastografía (TEG).
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que las células endoteliales se inmovilizan sobre microperlas, preferentemente sobre microperlas de dextrano.
10
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células endoteliales son células endoteliales de crecimiento (OEC), células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), células dérmicas endoteliales microvasculares humanas (HDMEC) o células endoteliales de la vena safena humana (HSVEC).
15
5. Kit que comprende un dispositivo para realizar pruebas viscoelásticas (VET) y células endoteliales inmovilizadas, especialmente para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
20

Fig. 2

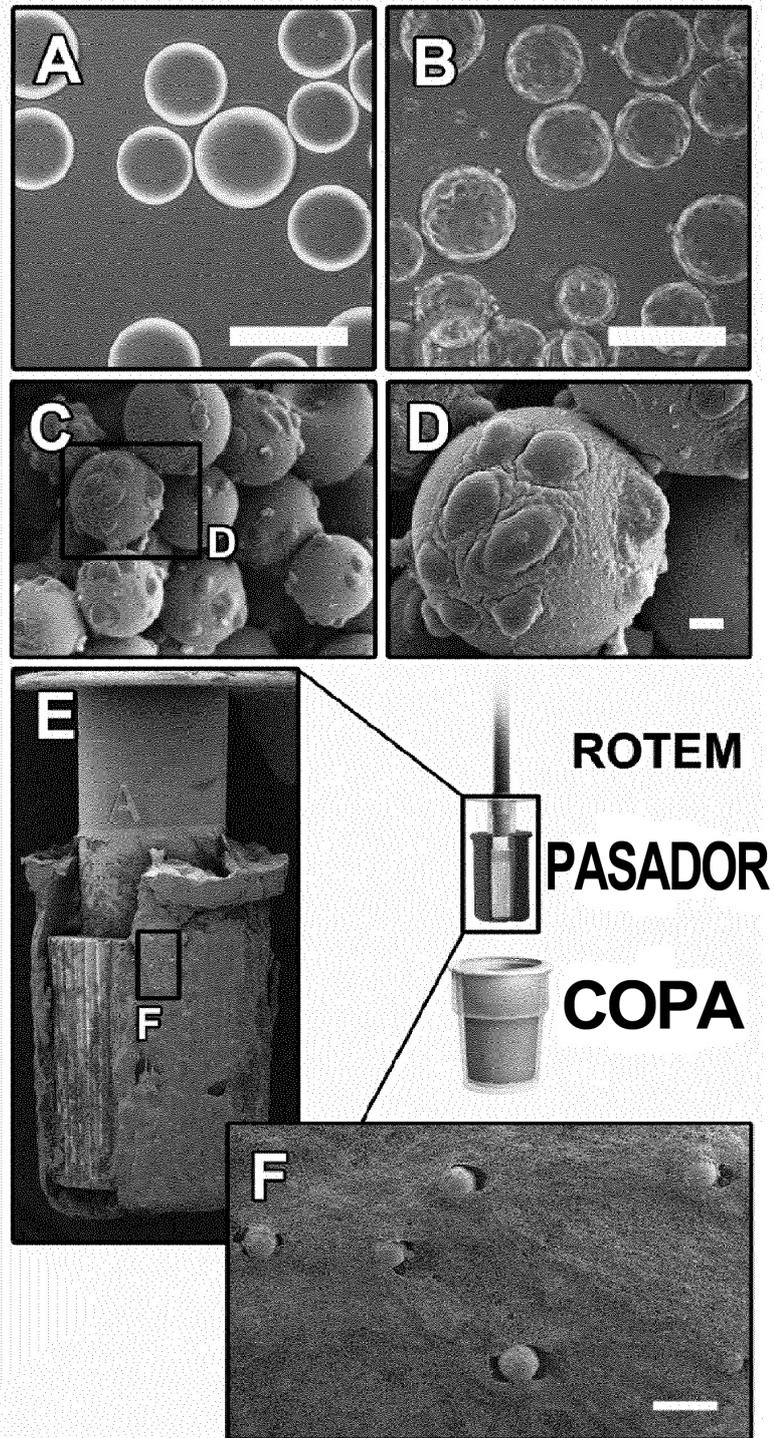


Fig. 3A

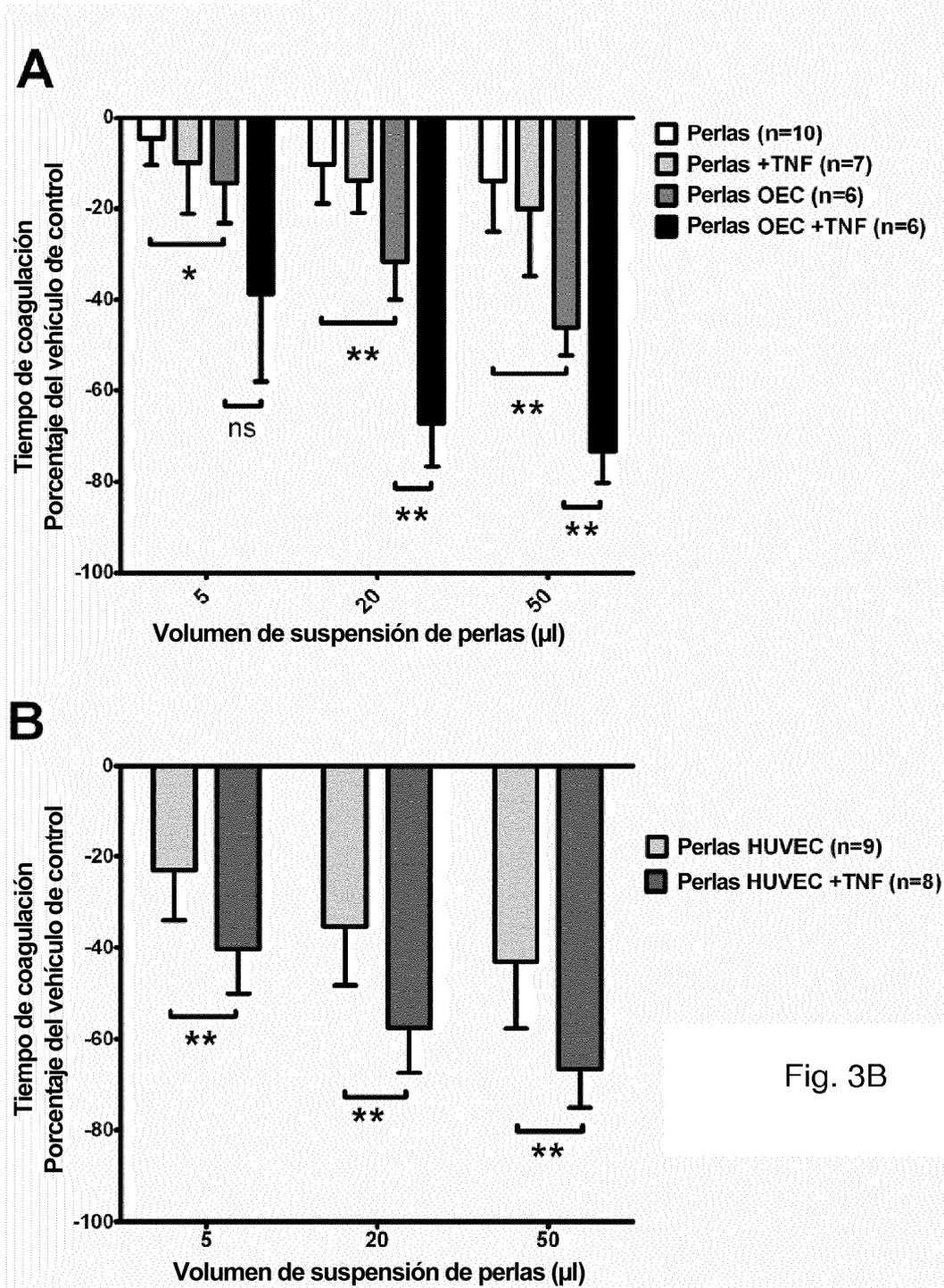


Fig. 3B

Fig. 4

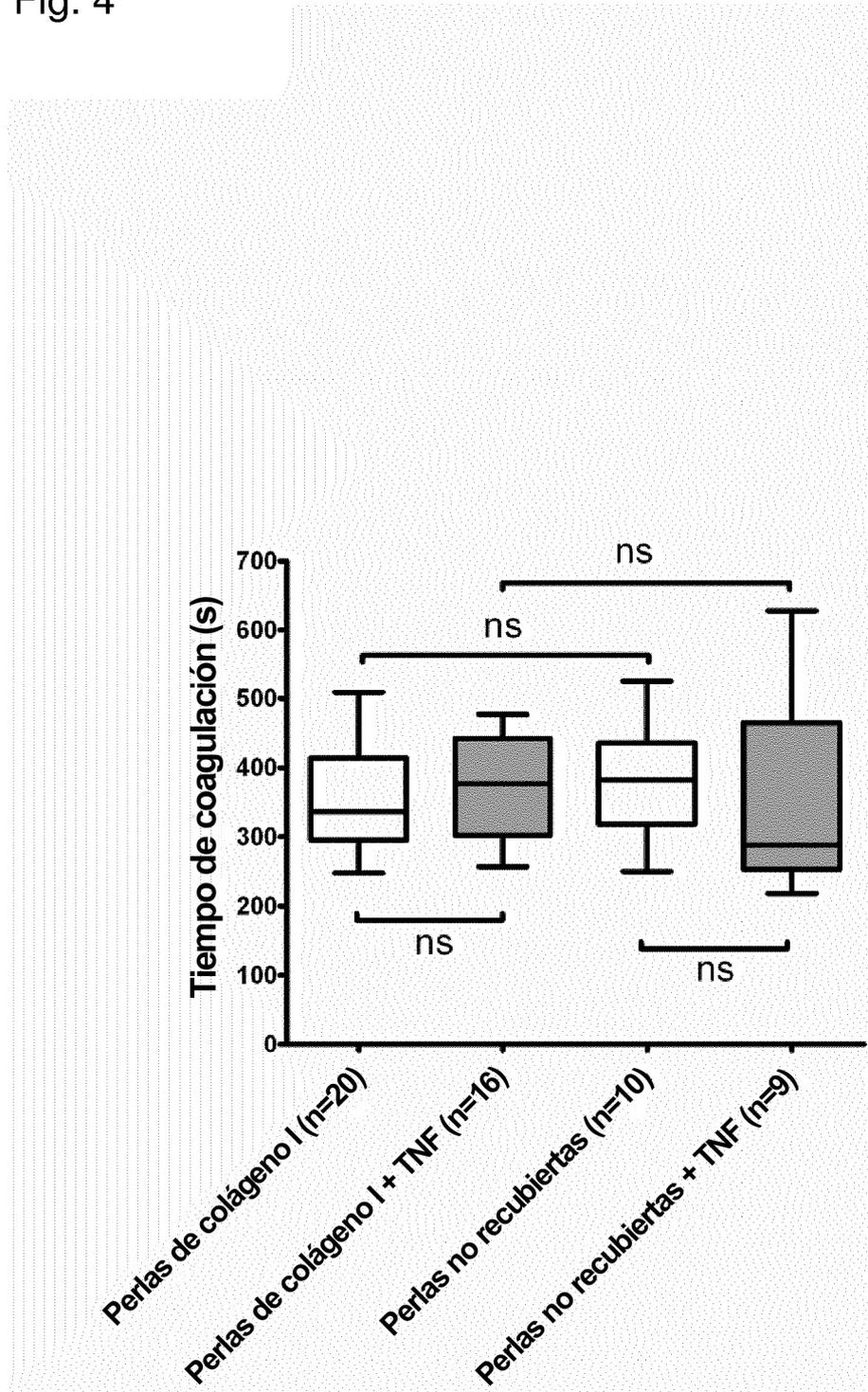


Fig. 5A

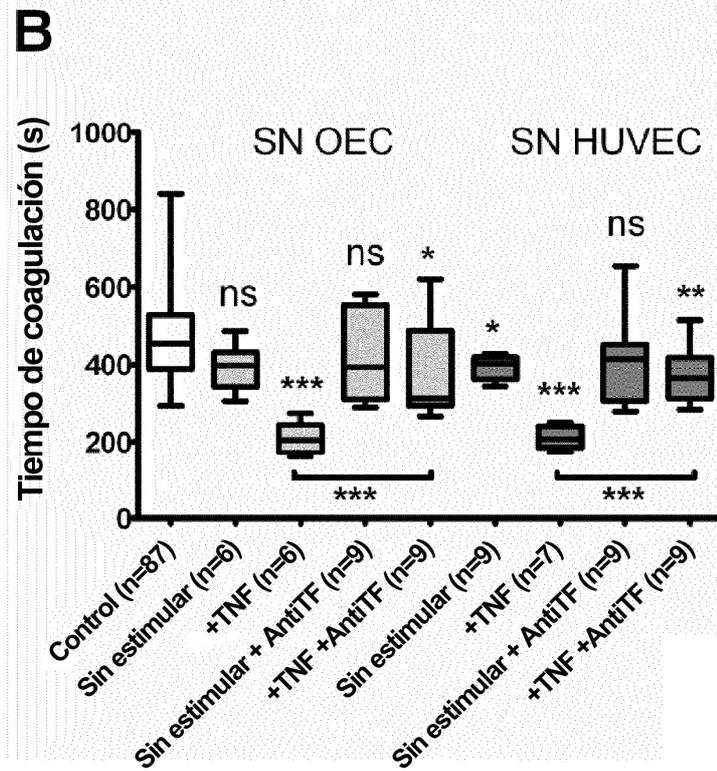
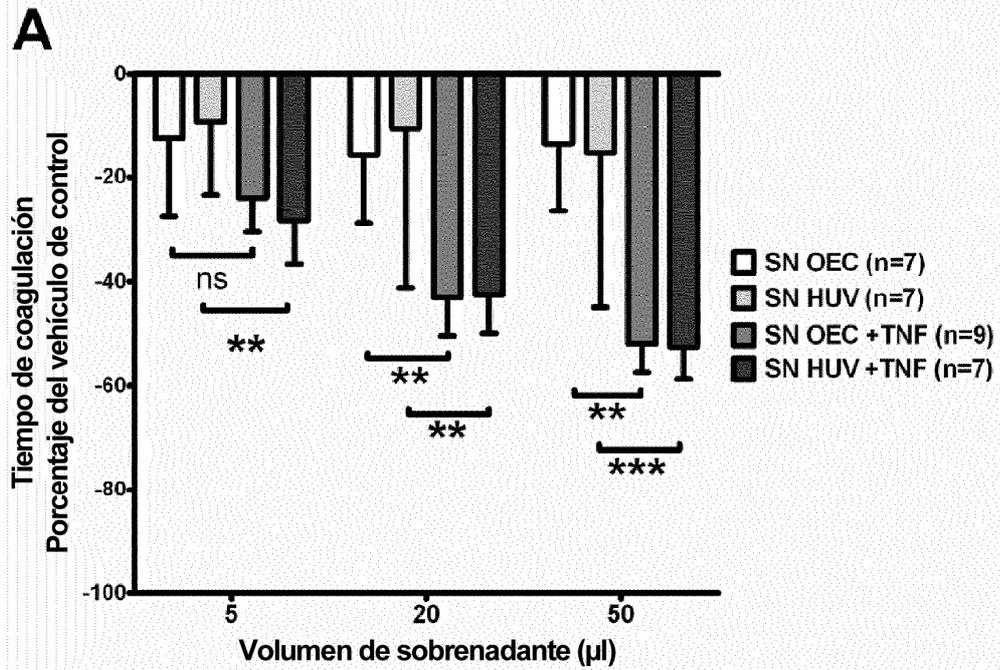


Fig. 5B