

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 824**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 11/16** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2013 E 17152097 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 3176584**

54 Título: **Procedimiento de medición de la coagulación de muestras de sangre utilizando ensayos viscoelásticos (VET)**

30 Prioridad:

**06.12.2012 EP 12195804**

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

**13.02.2019**

73 Titular/es:

**C A CASYSO GMBH (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:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 699 824 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 de medición de la coagulación de muestras de sangre utilizando ensayos viscoelásticos (VET)

La invención se refiere a procedimientos que implican ensayos viscoelásticos (VET, *viscoelastic test*).

La homeostasis es un proceso fisiológico completo que aglutina una amplia serie de factores plasmáticos, células sanguíneas y endotelio. El entendimiento clásico de una reacción similar a una cascada a gran escala, dirigida por parámetros cinéticos bioquímicos y dependientes de sustratos aislados, se ha reemplazado por un modelo de coagulación basado en células. Tras su iniciación por células de tipo fibroblastos, que expresan TF, el proceso de coagulación se amplifica en la superficie de plaquetas activadas y conduce a una acumulación de proteasas activas y cofactores que finalmente da como resultado la formación explosiva de trombina y la generación de fibrina. El inicio de la coagulación, la dinámica y degradación dependen de la disponibilidad de factores de coagulación plasmática pero también están muy regulados por mediadores derivados de células. Recientes estudios reivindican la inclusión de todos los componentes de la hemostasia en los ensayos de coagulación contemporáneos: plasma, sangre y células endoteliales (Holcomb y col. *Ann. Surg.* 256 (2012): 476-486).

Se realizan ensayos de laboratorio habituales que analizan el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) utilizando plasma sin células sanguíneas, que se han eliminado por centrifugación. A diferencia de los ensayos de laboratorio habituales, los ensayos viscoelásticos (VET), tales como tromboelastometría rotacional (ROTEM) o tromboelastografía (TEG), pueden realizarse con sangre entera, proporcionando una visión más exhaustiva de los procesos de coagulación. Los VET se utilizan en general como una herramienta de control ambulatoria para dirigir terapias hemostáticas en el contexto clínico (Ganter y col. *Anesth. Analg.* 106 (2008): 1366-1375).

TEG/ROTEM ya ofrecen parámetros de coagulación que implican el impacto de las células sanguíneas, pero los mediadores pro y anti-coagulantes derivados del endotelio circundante aún no se han incluido en los VET. Se sabe que las células endoteliales activadas facilitan la coagulación expresando moléculas de adhesión, regulando negativamente las proteínas antitrombóticas, expresando procoagulantes y liberando vesículas de membrana.

Sin embargo, además de los componentes sanguíneos presentes en dichos VET clásicos (células sanguíneas, plaquetas, componentes plasmáticos, factores de coagulación, moduladores de coagulación, etc.) también las células endoteliales tienen una influencia relevante sobre la coagulación sanguínea. Ha habido diversas solicitudes por parte científicos líderes en el presente campo, para incluir el componente de células endoteliales en los VET (Holcomb y col. (2012); Johansson y col., *Med. Hypoth.* 75 (2010): 564-567), sin embargo, hasta ahora, la influencia directa de las células endoteliales aún no puede investigarse con los VET disponibles actualmente. Se ha investigado una influencia indirecta de las células endoteliales sobre los VET, poniendo en contacto sangre con células endoteliales, eliminando las células endoteliales y midiendo después la coagulación sanguínea por tromboelastografía, TEG (Shankaraman y col., *J. Biomed. Mater. Res. (B)* 100B (2012): 230-238); sin embargo, este ensayo pretendía someter a ensayo la utilidad del uso de TEG para estudiar la trombogenicidad de biomateriales. Existe una necesidad continua de proporcionar dichos VET que observen la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación sanguínea en el presente campo.

Amirkhosravi y col. (*Throm. Res.* 84 (1996): 323-332) desvelan la determinación de la actividad procoagulante de células tumorales por análisis SONOCLOT™ en sangre entera. Yu y col. (*Adv. Healthc. Mat.* 1 (2012): 199-213) informan sobre la hemocompatibilidad dependiente de la estructura de los hidratos de carbono de cepillos poliméricos con función biomimética en la superficie.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento en el que también se incorporen células endoteliales en los VET.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para medir la coagulación de muestras de sangre o plasma utilizando ensayos viscoelásticos (VET) en los que la medición comprende girar un vástago en una copa que contiene sangre o plasma, y en el que la medición se realiza en presencia de células endoteliales inmovilizadas

Con la presente invención, por primera vez, es posible analizar la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación sanguínea en los VET. Por consiguiente, con la presente invención, se proporcionan nuevos VET que introducen superficies portadoras de células endoteliales, especialmente microperlas, para medir el impacto directo de las células endoteliales sobre la coagulación. Cuando el procedimiento se realiza con microperlas, las microperlas con las células endoteliales en su superficie se suspenden en la copa de medición del dispositivo de ensayo viscoelástico 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 sanguíneo estabilizado y analizado. Las células endoteliales añadidas se adhieren preferentemente a una superficie de colágeno, que representa una reproducción adecuada de la situación *in vivo*.

Los VET se conocen desde hace mucho tiempo, incluidos los dispositivos VET adecuados para el control de la coagulación que evalúan las propiedades viscoelásticas de la sangre. Los VET establecidos incluyen TEG y ROTEM con muchas variaciones disponibles para estos procedimientos (véase, por ejemplo, Gantner y col., 2008). Los VET

proporcionan información global sobre la dinámica del desarrollo, estabilización y disolución del coágulo que reflejan la hemostasia *in vivo*. Los VET se utilizan frecuentemente como ensayos ambulatorios para controlar a pacientes en cirugía (compleja mayor) o a pacientes con traumatismo. Se ha demostrado que dicho control reduce significativamente el uso de la terapia con componentes sanguíneos y la pérdida de sangre en general (véase, por ejemplo, Schöch y col., Crit. Care 14 (2010): R55).

Típicamente, los VET se realizan añadiendo sangre entera a una cubeta calentada a 37 °C. Dentro de la copa se suspende un vástago conectado a un sistema detector - es decir un cable de torsión en el caso de un dispositivo TEG y un detector óptico en el caso de un dispositivo ROTEM. La copa y el vástago se mueven uno con respecto al otro a través de un ángulo de 4°45'. El movimiento se inicia ya sea desde la copa (TEG) o desde el vástago (ROTEM). A medida que la sangre coagula, las hebras de fibrina que se forman entre la copa y el vástago y el giro de la copa se transmiten al vástago en el caso de la TEG o impiden el giro del vástago en el caso de ROTEM. Los patrones de cambio en cuanto a fuerza y elasticidad en la coagulación sanguínea proporcionan información sobre como de bien puede realizarse la hemostasia (la interrupción del flujo sanguíneo) y como de bien o de mal diferentes factores contribuyen a la formación de coágulos.

Normalmente, en este ensayo, se determinan (al menos) cuatro valores que representan la formación de coágulos: el valor R (o tiempo de reacción), el valor K, el ángulo y la AM (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 alcanza los 20 mm y esto representa la velocidad de formación del coágulo. El ángulo es la tangente de la curva realizada cuando se alcanza la K y ofrece información similar a la K. La AM es un reflejo de la fuerza del coágulo. Para determinar un índice de coagulación (IC) (o evaluar globalmente la coagulabilidad) puede utilizarse una fórmula matemática determinada por el fabricante, que tiene en cuenta la contribución relativa de cada uno de estos 4 valores en 1 ecuación. Aunque la TEG originalmente implica sangre entera reciente, no anticoagulada, tanto la TEG como la ROTEM comúnmente emplean sangre entera citrada, que se recalifica para iniciar la coagulación. Es también habitual utilizar un activador, como el factor tisular (FT), ya que esto estandariza el ensayo y además acelera la velocidad a la que se produce la coagulación y, por tanto, la velocidad a la que se genera un resultado. Los dispositivos TEG y ROTEM tienen diversos canales distintos que permiten procesar diversas muestras simultánea o secuencialmente.

La tromboelastometría (TEM) es también un procedimiento viscoelástico establecido para los ensayos de hemostasia en sangre entera. La TEM investiga la interacción de factores de coagulación, sus inhibidores, fármacos anticoagulantes, células sanguíneas, específicamente plaquetas, durante la coagulación y 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 los trastornos de coagulación sanguínea y los efectos farmacológicos, la TEM se utiliza principalmente en combinación con ensayos diferenciales apropiados. Permiten realizar ensayos en presencia de concentraciones terapéuticas de heparina y proporcionan información diagnóstica diferencial para confirmar decisiones en terapia. La TEM detecta fases hipo e hiperfuncionales del proceso de coagulación y es probablemente el único ensayo rápido y fiable para el diagnóstico de hiperfibrinólisis. A diferencia de los ensayos de coagulación convencionales, el efecto estabilizador 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 hemostasia y mejora la terapia hemoderivados, concentrados de factor, anticoagulantes y protamina, hemostáticos y antifibrinolíticos. En una TEM típica, la sangre (300 µl, anticoagulada con citrato) se coloca en la cubeta desechable utilizando una pipeta electrónica. Un vástago desechable se conecta a un eje que está conectado con un resorte fino (el equivalente a un cable de torsión de Hartert en TEG) y oscila lentamente hacia atrás y hacia delante. La señal del vástago suspendido en la muestra de sangre se transmite mediante un sistema detector óptico. El ensayo se inicia añadiendo reactivos apropiados. El instrumento mide y muestra gráficamente los cambios en la elasticidad en todas las fases del desarrollo y resolución del coágulo. La temperatura típica del ensayo es también en este caso de 37 °C, aunque pueden seleccionarse diferentes temperaturas, por ejemplo, en pacientes con hipotermia. A diferencia de la TEG con su principio similar a un péndulo, el diseño del sistema de detección viscoelástica TEM lo hace bastante fuerte e insensible contra choques o vibraciones mecánicas.

Los ensayos viscoelásticos (VET), disponibles en el comercio, especialmente diversas formas de TEG y ROTEM, se desvelan, por ejemplo, en Ganter y col., 2008: Typically, blood samples are activated extrinsically (tissue factor) and/or intrinsically (contact activator). Asimismo, para determinar niveles de fibrinógeno, deben realizarse ensayos en presencia de un inhibidor de plaquetas (por ejemplo, citocalasina D en fib-TEM). Esta amplitud máxima/máxima firmeza del coágulo (AM/MFC) modificada representa por tanto el coágulo de fibrina que se ha desarrollado sin la contribución de plaquetas, es decir, el fibrinógeno funcional. Se ha demostrado que la AM/MFC de estos ensayos modificados se correlaciona bien con el fibrinógeno evaluado por el procedimiento de Clauss ( $r = 0,85$ ; TEG 5000 User Manual y  $r = 0,7511$ ). Sin embargo, el procedimiento de Clauss tradicional, determina niveles de fibrinógeno indirectamente: el exceso de trombina se añade a plasma diluido, el tiempo se mide hasta que se desarrolla un coágulo y el fibrinógeno se calcula con la ayuda de una curva de calibración. Aunque el procedimiento de Clauss se considera como un ensayo estándar, se ha demostrado que la hemodilución con coloides puede interferir con estos ensayos, presentando niveles incorrectamente altos de fibrinógeno.

Los VET preferidos son TEG, ROTEM, ReoRox™ y SONOCLOT™, especialmente TEG y ROTEM. Los TEG preferidos son RapidTEG, TEG-Caolin (con caolin como activador; para la evaluación de la coagulación global y de

la función plaquetaria), TEG-heparinasa (utilizando caolin y heparinasa para la detección específica de heparina (es decir, un ensayo con caolin modificado añadiendo heparinasa para inactivar la heparina presente), mapeo de plaquetas TEG (ADP y ácido araquidónico para la función plaquetaria, controlando la terapia antiplaquetaria (aspirina, ADP, inhibidores GPIIb/IIIa), y TEG-Nativa (sin activadores/inhibidores añadidos para un ensayo no activado; también utilizado para realizar ensayos de hemostasia personalizados). Los ROTEM preferidos son ex-TEM (con FT para ensayar la ruta extrínseca; la evaluación rápida de la formación del coágulo y la fibrinólisis), in-TEM (con un activador de contacto para ensayar la ruta intrínseca; evaluar la formación del coágulo y la polimerización de la fibrina), fib-TEM (con FT y un antagonista de plaquetas para la evaluación cualitativa de los niveles de fibrinógeno), ap-TEM (con FT y aprotinina para evaluar la ruta fibrinolítica; detección rápida de la fibrinólisis cuando se utiliza junto con ex-TEM), Hep-TEM (con un activador de contacto y heparinasa para la detección específica de heparina (ensayo in-TEM modificado añadiendo heparinasa para inactivar la heparina presente), eca-TEM (con ecarina para la gestión de los inhibidores directos de trombina (por ejemplo, hirudina, argatrobán)), tif-TEM (con 1:1000 de FT para la ruta extrínseca); controlando el factor VIIa recombinante activado), naTEM (sin activadores/inhibidores añadidos; ensayo no activado; también utilizado para realizar ensayos de hemostasia personalizados). 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 aprotinina)), gbACT (con perlas de vidrio para evaluar la coagulación global y la función plaquetaria), H-gbACT (con perlas de vidrio y heparinasa para evaluar la coagulación global y la función plaquetaria en presencia de heparina; detección de heparina), microPT\* (con 1:1000 de FT para evaluar la ruta extrínseca; controlar el factor VIIa activado recombinante), Native (sin activadores/inhibidores añadidos; ensayo no activado; también utilizado para realizar ensayos de hemostasia personalizados).

Como ya se ha desvelado anteriormente, la presente invención permite, por primera, analizar la influencia directa de las células endoteliales sobre la coagulación sanguínea en los VET. En Amirkhosravi y col., 1996, se añadieron células endoteliales en suspensión a sangre entera en un VET. Sin embargo, en esta configuración, estas células endoteliales se utilizaron como controles para células tumorales procoagulantes y no - como es el caso de la presente invención - como configuración para simular los tres componentes de la circulación sanguínea - plasma sanguíneo, células sanguíneas 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 sanguínea. La naturaleza innovadora de la presente invención también refleja 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 y col., *Thromb. Haemost.* 109 (2013): 869-877).

A diferencia de las células endoteliales inmovilizadas de la presente invención, las células endoteliales añadidas en Amirkhosravi y col., 1996 (HUVEC) no tenían (y no estaba previsto que tuvieran) ningún efecto sobre la coagulación. Esto contrasta notablemente con las enseñanzas obtenidas con la presente invención con células endoteliales inmovilizadas. Esta diferencia sorprendente obtenida entre Amirkhosravi y col., 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 y col., *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 superficies, especialmente microperlas. Las superficies, especialmente las microperlas, permiten un revestimiento fisiológico y estudiar las células endoteliales de una manera mucho más apropiada y prácticamente relevante, porque la coagulación sanguínea se imita de forma mucho más próxima. Además del hecho de que para estudiar las células adherentes estas células deben mantenerse de una manera adherente, solo el procedimiento de acuerdo con la presente invención ha demostrado permitir resultados técnicamente reproducibles, ya que las células inmovilizadas pueden utilizarse inmediatamente y durante un periodo de tiempo más largo a diferencia de una suspensión celular libre (como aplican Amirkhosravi y col., 1996), que se tiene que preparar especialmente para cada medición, tratando las células con enzimas (tripsina), lavado posterior, 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 y col., 1996, se adherirán a las superficies de plástico a las pocas horas y no puede conseguirse 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 pueden mantenerse durante varios días/semanas con un número de células relativamente estable y la posibilidad de un uso inmediato. Los inconvenientes del uso de las células endoteliales en los VET se han eludido elegantemente con el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Además, el uso de estas células que imitan más estrechamente la coagulación sanguínea *in vivo* nunca se ha contemplado en la técnica anterior y, por supuesto, tampoco en Amirkhosravi y col., 1996 (de hecho, en este documento tenían un objetivo completamente diferente).

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

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

Hay varios tipos de microtransportadores celulares disponibles, 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 envases de cultivo de células móviles. Los materiales básicos para la fabricación de microtransportadores incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, acrilamida, gelatina porcina, dextrano, etc. Los biopolímeros como el dextrano se pueden reticular químicamente con otras moléculas orgánicas grandes como el colágeno y, por tanto, son ventajosos para simular la adherencia de las células a una lámina basal. En este aspecto, se ha descubierto que los biomateriales revestidos con colágeno poseen una trombogenicidad relativamente baja cuando se exponen a la sangre (Shankarraman y col, J. Biomed. Mater. Res. (B) 100B (2012): 230-238). Las microperlas son partículas poliméricas uniformes de 0,1 a 1000, preferentemente de 0,5 a 500 micrómetros de diámetro. Las células endoteliales pueden sembrarse en su superficie y utilizarse de acuerdo con la presente invención. En una realización, las microperlas desveladas 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, microvarillas, 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 se fabrican 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 revestidas, por ejemplo, con dextrano o dextranos reticulados que están revestidos con fibronectina, albúmina, polilisina o polímeros naturales, tales como colágeno, fibrina, alginato, quitosano, gelatina etc. La unión de las células endoteliales a las microperlas se realiza de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica para la unión de células a superficies sólidas, especialmente microperlas. Preferentemente, la superficie es "atractiva" para las células endoteliales de tal manera que las células endoteliales se adhieran a esta superficie, por ejemplo, por la unión de la integrina.

Aunque en principio pueden utilizarse 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 (OEC, *outhgrowth endothelial cells*), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVE, *human umbilical vein endothelial cells*), células dérmicas endoteliales microvasculares humana (HDMEC, *human dermal microvascular endothelial cells*; como modelo para las células endoteliales microvasculares) o células endoteliales de la vena safena humana (HSVEC, *human saphenous vein endothelial cells*; como modelo para células endoteliales macrovasculares).

Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza con sangre y las células obtenidas del mismo donante (entorno autólogo). Sin embargo esto no es obligatorio ya que las HUVEC y las OEC agrupadas tuvieron el mismo efecto sobre los parámetros viscoelásticos. Esto muestra que pueden sembrarse diversos tipos de células endoteliales en microperlas para incluir la parte endotelial de la hemostasia en los VET. Cuando se proporcionan en condiciones que permiten el transporte de células vivas (es decir ultracongeladas), las perlas revestidas con endotelio pueden proporcionarse convenientemente como un kit de ensayo.

La presente invención se centra en el impacto directo de las células endoteliales en los VET. Con la presente invención se introduce y valida un nuevo procedimiento para incluir CE adherentes en VET, especialmente en ensayos de tromboelastometría, para evaluar su impacto sobre los parámetros de coagulación. También se desvela un kit que comprende un dispositivo para realizar ensayos viscoelásticos (VET) y células endoteliales inmovilizadas, especialmente para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, el kit comprende al menos dos elementos distintos, el dispositivo para realizar los 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, porque 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, de tal manera que no podría medir ninguna señal. Este kit permite, por primera vez, una simulación que funciona diligentemente para los procesos de coagulación de la sangre *in vivo*.

El dispositivo para realizar ensayos viscoelásticos (VET) puede ser cualquier dispositivo que se utilice para los VET conocidos; prácticamente todos los dispositivos VET (especialmente los preferidos descritos anteriormente) pueden utilizarse con las células endoteliales inmovilizadas de acuerdo con la presente invención.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras.

La Figura 1 muestra un flujograma 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 revestidas; B: OEC revestidas. Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ . C: Imagen SEM de perlas revestidas con OEC (falta la barra de escala); D: aumento de C. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ . E incorporación de microperlas no revestidas a un coágulo de sangre entera procedente de una copa ROTEM. F: sección aumentada de E. Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3 muestra (A) la reducción de TC aumentando los volúmenes de suspensión de perlas no revestidas o de perlas revestidas con OEC, con (+TNF) o sin preincubación con TNF $\alpha$  durante toda noche. (B) resultados con el aumento de los volúmenes de la suspensión de perlas revestidas con HUVEC con (+TNF) o sin incubación con TNF $\alpha$  durante toda noche. Los valores individuales se muestran como porcentaje negativo de un vehículo de

control medido simultáneamente. Las barras de error representan la media  $\pm$  DT. (\* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001).

La Figura 4 muestra el impacto de perlas desnudas, con revestimiento de colágeno y TNF $\alpha$  sobre el TC. La sangre se combinó con 50  $\mu$ l de perlas Cytodex 1 (sin revestir) y perlas Cytodex 3 revestidas con colágeno con preincubación opcional con TNF $\alpha$  (+TNF) durante toda la noche. Las barras de error representan la media  $\pm$  DT. (ns = no significativo).

La Fig. 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 revestidas con OEC o HUVEC que se habían preincubado opcionalmente con TNF $\alpha$  (+TNF). (B) Inhibición del FT en sobrenadantes de suspensión de perlas. La sangre se combinó con 50  $\mu$ l de medio no acondicionado (CTRL) o fluido sobrenadante de perlas revestidas sin estimular (no estimul.) o con OEC y HUVEC preincubadas con TNF- $\alpha$  (+TNF). Opcionalmente, los sobrenadantes se incubaron con un anticuerpo inhibidor contra el FT humano (+ AntiFT). Si no se indica lo contrario entre paréntesis, las mediciones se comparan con CTRL. Las barras de error representan la media  $\pm$  DT. (ns = no significativo, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001).

## 15 **Ejemplos:**

### Materiales y procedimientos

#### Cultivo celular

El estudio fue aprobado por el comité de ética local de la AUVA y se realizó de acuerdo con las normas de buena práctica clínica. Para 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 procedían de células progenitoras endoteliales (EPC), un pequeño subconjunto de células mononucleares (MNC) presentes en sangre periférica (Fuchs y col., *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 mediante PCRc y citometría de flujo. Los fenotipos endoteliales de las OEC incluidas 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 (Holthoner y col. *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 revestidas con HUVEC. Las HUVEC se adquirieron en Lonza (Walkersville, Md, EE. UU.) y se cultivaron en EGM-2.

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 (revestidas con colágeno) microtransportadoras 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 con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 4 h y se agitaron suavemente cada 20 min. Después de transferir la suspensión a un matraz de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One, Linz, Austria), las microperlas se incubaron opcionalmente con TNF $\alpha$  (Sigma Aldrich, Viena) a una concentración final de 10 ng/ml durante 12-16 h a 37 °C y con Co<sub>2</sub> al 5 % 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 revestidas con colágeno con perlas Cytodex 1 sin revestir (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) en un entorno idéntico.

#### Preparación de sobrenadante de cultivo y suspensiones de perlas.

Las perlas revestidas y el sobrenadante de cultivo celular acondicionado durante una noche se tomaron cuidadosamente con una pipeta serológica de 10 ml y transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml. Una vez que las perlas descendieron, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 1.500 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C inmediatamente para su análisis posterior mientras que al menos 200  $\mu$ l se quedan en los tubos se descartan para evitar la contaminación con células enteras y restos celulares. Las perlas se resuspendieron con EGM-2 reciente, previamente calentado (37 °C), golpeándolas suavemente contra la pared del tubo. De nuevo, después de la sedimentación, los sobrenadantes se descartaron. Para eliminar las células no adherentes y los restos celulares, esta etapa se repitió tres veces con PBS precalentado. Para conseguir una relación volumétrica 1:1 de perlas con respecto 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 posterior, se mantuvieron en un bloque caliente a 37 °C a lo largo de todos los experimentos y se procesaron en 3 horas. En la figura. 1 se ofrece un flujograma de trabajo esquemático del procedimiento

#### 55 ROTEM

ROTEM (TEM Innovation, Múnich, Alemania) utiliza un vástago de rotación que se sumerge verticalmente en una copa precalentada que contiene la muestra de sangre y puede realizarse simultáneamente en cuatro canales dentro del mismo dispositivo. La coagulación de la muestra de sangre normalmente citrada comienza por recalcificación y

es detectable a medida que la formación del coágulo de fibrina entre el vástago y la pared de la copa reduce el intervalo de rotación del vástago. La señal generada se convierte en una curva que da una indicación del punto de inicio de la coagulación, la calidad de los factores implicados y la aparición de fibrinólisis.

5 Después de obtener el consentimiento informado por escrito de un voluntario sano sin antecedentes de coagulopatía y/o terapia anticoagulante/antiplaquetaria, su sangre se extrajo utilizando estasis mínima de una vena anticubital a través de una aguja de 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 contenían 0,3 ml tamponados con citrato trisódico al 3,2 %. Las muestras se mantuvieron en una fase de precalentamiento a 37 °C durante al menos 10 minutos antes del análisis y se procesaron a las 3 horas. El análisis ROTEM de la muestra de SE se inició por recalcificación con la adición de 10 20 µl de CaCl<sub>2</sub> (star-TEM®, 200 mmol/l) según el protocolo del fabricante.

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 hacia arriba y hacia abajo. El volumen final de reacción por copa de ROTEM era de 370 µl, que consistía en 300 µl de sangre entera citrada, 20 µl de CaCl<sub>2</sub> y 50 µl de suspensión de perlas/sobrenadante. Para evaluar los cambios dependientes de la concentración en parámetros de TEM, se diluyeron 0, 5, 20 y 50 µl de la solución madre original con EGM-2 hasta el volumen de reacción final de 50 ml. 15

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

Inhibición de la actividad del factor tisular

25 Para evaluar el impacto de los mediadores endoteliales solubles se añadió el mismo volumen de sobrenadante de cultivo celular, diluido con EGM-2 a los ensayos NATEM.

El medio acondicionado se recogió de cultivos de microperlas estimulados con TNF-α durante toda la noche y sin estimular y se procesó como se ha indicado anteriormente. Para examinar el supuesto impacto del FT derivado de endotelio los sobrenadantes de cultivo se preincubaron con un anticuerpo inhibidor para los aminoácidos 1-25 dentro del dominio extracelular del factor tisular (FT de ratón contra ser humano de American Diagnostica, 0,5 mg/ml, ADG4509, clon IIID8). Experimentos previos han demostrado que este anticuerpo podía rescatar la reducción del TC de sangre entera en presencia de FT extrínseco (Nielsen y col. *Anaesth. Analg.* 104 (2007): 59-64). El anticuerpo se empleó con un movimiento suave a una dilución de 1:50 durante 1 hora a 37 °C en un agitador de rotación hecho a medida. 30

35 Microscopía

Antes y después del análisis ROTEM, se examinaron alícuotas de solución madre para la adherencia y cantidad de células endoteliales mediante microscopía de contraste de fase (Zeiss).

Las copas se retiraron del dispositivo después de generar 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 vástago 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 cubrieron rociando con oro paladio y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM, Jeol JSM-6510). 40

Análisis estadístico

Dado que se indica que los valores de referencia para los parámetros de tromboelastomería no activada (NATEM, *non-activated thromboelastometry*) se indican son objeto de una fuerte variación, el Tiempo de Coagulación (TC), el Tiempo de Formación del Coágulo (TFC), la Firmeza Máxima del Coágulo (FMC), el ángulo alfa (α) y A30, se convirtieron al porcentaje del vehículo de control respectivo medido simultáneamente. Los datos se incluyeron en una hoja de datos Excel, se analizaron con el programa informático GraphPad Prism 5 (Programa informático GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) y se indicaron como media ± desviación típica. Basándose en un ensayo de Kolomorogov-Smirnov se determinó que los datos no estaban distribuidos normalmente. Por lo tanto, se aplicó un ensayo de Mann-Whitney para comparar los valores de los volúmenes de suspensión correspondientes (5, 20, 50 µl) en grupos respectivos (desnudo frente a revestido con células, no estimulado frente a estimulado). Los valores de p <0,05 se consideraron significativos. 50

Resultados

55 Incorporación de células endoteliales en ROTEM.

Las células endoteliales adherentes pueden transferirse como una suspensión y por tanto incluirse en una ROTEM (Figuras 2A-D). Efectivamente, la evaluación al microscopio 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 los ensayos viscoelásticos. El análisis posterior de las imágenes al microscopio electrónico de barrido (SEM, *scanning electron microscopic*) 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 ninguna diferencia en la dispersión de las perlas revestidas con células o desnudas (Figuras 2E, F).

#### Impacto de las células endoteliales sobre ROTEM

La inclusión de perlas revestidas con células endoteliales en el análisis ROTEM redujo significativamente el TC de una manera dependiente de la dosis (Figura 3A). Utilizando diferentes volúmenes de suspensiones de microperlas (5, 20, 50  $\mu$ l), el TC no solo se redujo con células activadas, sino también con células no se habían estimulado con TNF $\alpha$ . La adición de los volúmenes de suspensión de perlas revestidas con células no estimuladas redujo significativamente el TC en comparación con un volumen igual de controles no revestidos. La activación previa de células por incubación con TNF $\alpha$  dio como resultado una reducción significativa adicional del TC. Para confirmar los hallazgos presentes con CE derivadas de otro tejido, estos experimentos se repitieron con microperlas revestidas con HUVEC. El aumento de los volúmenes de la suspensión de perlas revestidas con HUVEC dio como resultado una reducción similar del TC (Figura 3 B). De nuevo, esta mejora del inicio de la coagulación era detectable tanto con células estimuladas con TNF $\alpha$  como con células no estimuladas.

Las suspensiones de perlas desnudas, opcionalmente preincubadas con TNF $\alpha$ , sirvieron como un control y redujo el TC en menor medida. A diferencia de los efectos significativos sobre el inicio de la coagulación, los parámetros de la formación del coágulo no se alteran en presencia de endotelio. Los parámetros de ROTEM del Tiempo de Formación del Coágulo (TFC), Máxima firmeza del Coágulo (MFC) y ángulo  $\alpha$  ( $\alpha$ ) no mostraron ningún efecto de los mediadores derivados del endotelio sobre la dinámica de la coagulación y la fuerza del coágulo.

Además, no pudo confirmarse la activación esperada de la coagulación por la superficie de colágeno de las perlas Cytodex 3 empleadas. En realidad, la comparación de los resultados de perlas Cytodex 1 no revestidas y de perlas Cytodex 3 revestidas con colágeno, no mostró ningún efecto del revestimiento del colágeno en el inicio de la coagulación en el ensayo de NATEM (Fig. 4).

#### Impacto de mediadores endoteliales solubles

Para analizar indirectamente si la reducción del TC también estaba asociada a la liberación endotelial de mediadores procoagulantes en su entorno, se recogió medio acondicionado de cultivos de CE y se añadió a la copa ROTEM a volúmenes cada vez mayores. Los cultivos de CE se habían incubado opcionalmente durante una noche con TNF $\alpha$ . La adición de 5, 20 o 50  $\mu$ l de sobrenadantes de cultivo celular recogido de la suspensión de perlas de OEC y HUVEC reduce el TC de manera similar al de un volumen equivalente de perlas microtransportadoras revestidas con células. De nuevo, una incubación previa de las células con TNF $\alpha$  dio como resultado una reducción significativa del TC en comparación con sobrenadantes procedentes de los controles no tratados (Figura 5A).

#### Inhibición del factor tisular

Dado que se supuso que la reducción del TC tanto con perlas revestidas con CE como con medio acondicionado con CE estaba asociada a la mayor disponibilidad del FT basado en células y soluble, se intentó restablecer los TC normales inhibiendo específicamente la actividad del FT.

Por lo tanto, suspensiones de perlas y sobrenadantes de cultivo celular se incubaron con un anticuerpo inhibidor contra el dominio extracelular del FT humano.

La preincubación de suspensiones de perlas con el anticuerpo anti FT rescató al menos parcialmente la reducción observada del TC (Fig. 5 B).

Cuando se incubaba con el anticuerpo inhibidor antes de realizar las mediciones tromboelastométricas, 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultivos OEC y HUVEC casi alcanzaron la capacidad de coagulación de un mismo volumen de medio no acondicionado, que se denomina control.

#### Análisis

De acuerdo con la presente invención, se estableció con éxito un sistema de ensayo que incluía los tres componentes de la coagulación, el plasma, las células sanguíneas y el endotelio. Los hallazgos de la presente invención demuestran 1) que las CE puede incorporarse eficazmente en un ensayo de ROTEM a través de microperlas revestidas con colágeno, 2) una aceleración de la coagulación mediante CE activadas y no activadas, así como 3) una liberación de procoagulante endotelial, componentes que llevan el FT en su entorno.

Utilizando perlas Cytodex™ como microtransportadores para células endoteliales adherentes a una matriz de colágeno, esferas con una superficie algo parecida a la pared de un vaso, se incorporaron en un ensayo de

coagulación *ex vivo* basado en ROTEM con facilidad de operabilidad y reproducibilidad. Las perlas Cytodex™ han demostrado ser útiles como microtransportadores para células adherentes y se han utilizado en diversas aplicaciones de cultivo celular, incluyendo estudios de angiogénesis *in vitro*.

5 Dado que los microtransportadores aplicados se revistieron con colágeno I, se consideró un posible efecto sobre el TC incluso en experimentos que incluían perlas sin CE. El colágeno, como parte de la matriz subendotelial, tiene un potencial altamente pro-trombogénico cuando se expone a la sangre que fluye. Después de una lesión, las plaquetas en circulación se adhieren firmemente al colágeno fibrilar a través del receptor de la glucoproteína IIb-IIIa a velocidades de baja cizalla. En vista de esto, 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 TFC. Sin embargo, las mediciones del inicio de la coagulación con perlas revestidas con colágeno no difirieron significativamente de las perlas Cytodex 1 no revestidas. La perlas Cytodex 3 poseen una capa fina de colágeno desnaturalizado, que se reticula químicamente a dextrano. De acuerdo con 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 glucoproteínas, bajo tensión de cizalla.

En un estudio reciente, se evaluó el potencial trombogénico de sangre incubada anteriormente con células endoteliales sobre diferentes proteínas de matriz por TEG, pero las células no estaban presentes durante las mediciones de la coagulación. Los valores del TC de sangre con HUVEC que se habían cultivado en colágeno I, eran considerablemente más altos que los medidos con las células en las superficies compuestas de otra manera.

20 De manera similar, se pudo descartar la influencia de posibles trazas de TNF $\alpha$  que no se habían eliminado con las etapas de lavado durante el procesamiento de suspensiones de perlas. De hecho, el medio acondicionado para los experimentos con sobrenadante todavía contenía la concentración final de TNF $\alpha$  para la estimulación de las células endoteliales. El TNF $\alpha$  es un mediador importante en la señalización inflamatoria en numerosos tipos de células, tales como macrófagos, y podría afectar a la coagulación de la sangre entera que se asemeja a la incubación de lipopolisacárido. Sin embargo, es poco probable que el TNF $\alpha$  restante en las suspensiones pudiera inducir una reacción fisiológica en el periodo de tiempo relativamente corto de la medición del tiempo de coagulación tromboelastomérica desde que se añade a la sangre justo antes del análisis.

30 Con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, las células endoteliales en reposo y activadas se incluyeron en un ensayo de ROTEM para rastrear su impacto sobre los parámetros de coagulación. A diferencia de las expectativas razonables, que sugieren un efecto anticoagulante del endotelio en reposo en ensayos de coagulación, el TC se redujo incluso en presencia de células endoteliales quiescentes. La reducción observada del TC fue eminentemente mejorada después de la incubación previa de las células con TNF $\alpha$ . Mientras que se aceleró el inicio de la coagulación sanguínea (TC), los parámetros de la dinámica de coagulación (TCF,  $\alpha$ ) y fuerza del coágulo (MCF, A30) permanecieron intactos. La activación de la coagulación por un aumento de la disponibilidad del FT no afecta a la fuerza del coágulo y a la dinámica de la polimerización. En un estudio reciente de tromboelastometría, se ha demostrado que la activación extrínseca con el FT reduce el TC pero deja otros parámetros de VET inalterados.

40 Dos tipos diferentes de células endoteliales, OEC y HUVEC, ambas adherentes a una superficie de colágeno, afectaron 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 para reproducir los resultados obtenidos en un modelo endotelial bien caracterizado. Ambos tipos de células respondieron a la activación con TNF $\alpha$  y a la reducción más exagerada del TC. Los presentes resultados no solo sugieren el cambio de las células a un fenotipo protrombótico, sino también una liberación de mediadores procoagulantes en el medio circundante en respuesta a la activación. Este patrón procoagulante estaba incluso presente después del aclarado y reemplazo del medio. Además, las propiedades protrombóticas del sobrenadante no se vieron perjudicadas por la centrifugación.

50 Por lo tanto, se supuso que la exposición de las células a TNF $\alpha$  induce un potente activador de la coagulación, que estaba presente en una forma basada en células y soluble. El FT, que se produce en las membranas celulares, en la superficie de vesículas de membrana liberadas y en una isoforma soluble, se ha observado que reduce el tiempo de coagulación en TEG. En la técnica anterior, ya se ha informado acerca de una restauración del acortamiento inducido por el FT del TC por preincubación de la muestra de sangre con un anticuerpo dirigido contra el FT inhibitor. En los presentes ejemplos, los valores del TC se restauraron mediante el bloqueo del FT en el medio acondicionado con el mismo anticuerpo. Varios tipos de células endoteliales regulan positivamente la expresión del FT en respuesta a estímulos proinflamatorios, tensión de cizalla y exposición al flujo.

55 Sin embargo, en HUVEC no tratadas, la expresión del FT normalmente 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 sugirió una expresión débil, constitutiva del FT que probablemente surge del procedimiento de cultivo. La expresión del FT basal podría estar impulsada por la estimulación de diversos factores de crecimiento como el FGF2 y el VEGF en el medio EGM-2 completo que se utilizó en todos los experimentos.

A diferencia de la mayoría de los subtipos endoteliales *in vivo*, el FT se expresa en la superficie de las células endoteliales cultivadas como una reacción a citocinas inflamatorias. *In vivo*, la expresión del FT solo se podría demostrar en condiciones sépticas con flujo de sangre alterado y junto con tipos de tumores específicos. De hecho, el análisis viscoelástico de sangre entera, estimulada con lipopolisacáridos (LPS) tanto *in vitro* como *in vivo* reveló una activación de la coagulación sanguínea, lo que sugiere una mayor disponibilidad del FT, probablemente procedente de monocitos.

Además, diversos estudios confirmaron el FT sobre las micropartículas derivadas del endotelio *in vitro*, pero su presencia en las generadas *in vivo* y su papel real en la patogenia del cáncer, trombosis y endotoxemia todavía están sujetos a una intensa investigación. En la coagulación intravascular diseminada, el endotelio activado también proporciona el microambiente protrombótico que finalmente da como resultado una coagulopatía de consumo y la alteración de la microcirculación.

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 procoagulante de un estado inflamatorio en sangre entera se asoció con el FT derivado del endotelio. Se ha demostrado que el aumento de la disponibilidad del factor tisular reduce el TC *in vitro*. El FT es detectable en células endoteliales cultivadas tratadas con citocinas inflamatorias, en microvesículas 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 FT en la configuración experimental de acuerdo con la presente invención, se puede demostrar que es funcional y que activa la coagulación. Aunque el FT, como activador primario de la coagulación, se expresa en la respuesta endotelial y leucocitaria a las citocinas inflamatorias como la IL-1 o el TNF, su papel en las respuestas inflamatorias sistémicas de la coagulación todavía se está analizando. Los estudios *in vitro* revelan la expresión del FT y la liberación de micropartículas en HUVEC después de la activación, pero estos datos parecen difíciles de aplicar a la función endotelial durante la homeostasia en estado sano y enfermo.

Sin embargo, la interacción directa del endotelio con la coagulación sanguínea es difícil de evaluar ya que depende de los datos de los modelos de flujo de cultivo celular o incluye técnicas de formación de imágenes elaboradas *in vivo*. Los sistemas de flujo y ensayos de coagulación *in vitro* habituales con vistas a combinar mediadores endoteliales y componentes sanguíneos normalmente se basan en ensayos de laboratorio rutinarios. Dado que hubo un interés en la capacidad del endotelio para interferir directamente con la iniciación de la coagulación, los microtransportadores 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 entera. La estrategia de acuerdo con la presente invención, con perlas revestidas con endotelio en sangre entera proporcionó resultados muy reproducibles en relación con la iniciación de la coagulación en condiciones inflamatorias simuladas.

#### Conclusiones

Con la presente invención se proporciona un nuevo ensayo viscoelástico introduciendo microperlas transportadoras de CE en TEM, especialmente en ROTEM, con facilidad en cuanto a su funcionamiento y reproducibilidad. Impulsadas por el vástago de rotación del dispositivo ROTEM, las microperlas se distribuyeron homogéneamente dentro de la muestra de sangre, probablemente exponiendo las células endoteliales a bajas fuerzas de cizalla.

Introduciendo CE en VET, fue posible rastrear un mecanismo celular de hemostasia subyacente en condiciones fisiológicas y patológicas, es decir, una reducción del TC en sangre entera. Los hallazgos de acuerdo con la presente invención, muestran una activación directa de la coagulación por las CE en microperlas, especialmente cuando se activan con TNF. Además, hubo una fuerte evidencia de la liberación de componentes portadores de FT en el entorno celular.

#### Abreviaturas

CE = Células Endoteliales  
 A30 = Firmeza del coágulo después de 30 minutos  
 TC = Tiempo de Coagulación  
 TFC = Tiempo de Formación del Coágulo  
 CID = Coagulación Intravascular Diseminada  
 EGM-2 = Medio de Crecimiento Endotelial 2  
 HUVEC = Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana  
 MFC= Máxima Firmeza del Coágulo  
 NATEM = Tromboelastometría No Activada  
 OEC = Células Endoteliales en Crecimiento  
 PBS = Solución Salina Tamponada con Fosfato  
 PCRc = Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa  
 SEM = Microscopía Electrónica de Barrido  
 TEM = Tromboelastometría  
 FT = Factor Tisular  
 FvW = Factor de von Willebrand

SE = Sangre Entera  
VEGF = Factor de Crecimiento Endotelial Vascular  
VET = ensayo viscoelástico  
FGF2 = Factor 2 de Crecimiento de Fibroblastos  
FI-XIII= Factores de coagulación I-XIII

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de medición de la coagulación de una muestra de sangre o plasma utilizando un ensayo viscoelástico, en el que la medición comprende girar un vástago en una copa que contiene la sangre o el plasma y en el que la medición se realiza en presencia de células endoteliales inmovilizadas.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células endoteliales se inmovilizan en microperlas.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dichas microperlas comprenden dextrano o dextrano reticulado.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dichas microperlas están revestidas con fibronectina, albúmina, polilisina o polímeros naturales.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dichos polímeros naturales comprenden colágeno, fibrina, alginato, quitosano o gelatina.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dichos polímeros naturales comprenden colágeno.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 1-6, en el que durante la medición las células endoteliales inmovilizadas se suspenden en la sangre o en el plasma.
8. El procedimiento de las reivindicaciones 1-7, en el que la medición se realiza en presencia de  $\text{CaCl}_2$ .
- 15 9. El procedimiento de las reivindicaciones 1-8, que comprende, durante la medición, identificar un punto en el tiempo, R (tiempo de reacción), de la primera evidencia de coagulación de la muestra de sangre o plasma.
10. El procedimiento de las reivindicaciones 1-9, que comprende determinar una velocidad de formación de coágulos en la muestra de sangre o de plasma.
- 20 11. El procedimiento de las reivindicaciones 1-10, en el que las células endoteliales comprenden células endoteliales en crecimiento (OEC), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC), células endoteliales de la vena safena humana (HSVEC) o combinaciones de las mismas.
- 25 12. El procedimiento de las reivindicaciones 1-11, en el que las células endoteliales comprenden células endoteliales en crecimiento (OEC) o células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y en el que las células endoteliales se adhieren al colágeno.
13. El procedimiento de las reivindicaciones 1-12, en el que las células endoteliales son activadas.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que las células endoteliales son activadas mediante incubación con TNF $\alpha$ .
- 30 15. El procedimiento de las reivindicaciones 1-14, en el que la muestra de sangre o plasma y las células endoteliales se obtienen de un solo donante.

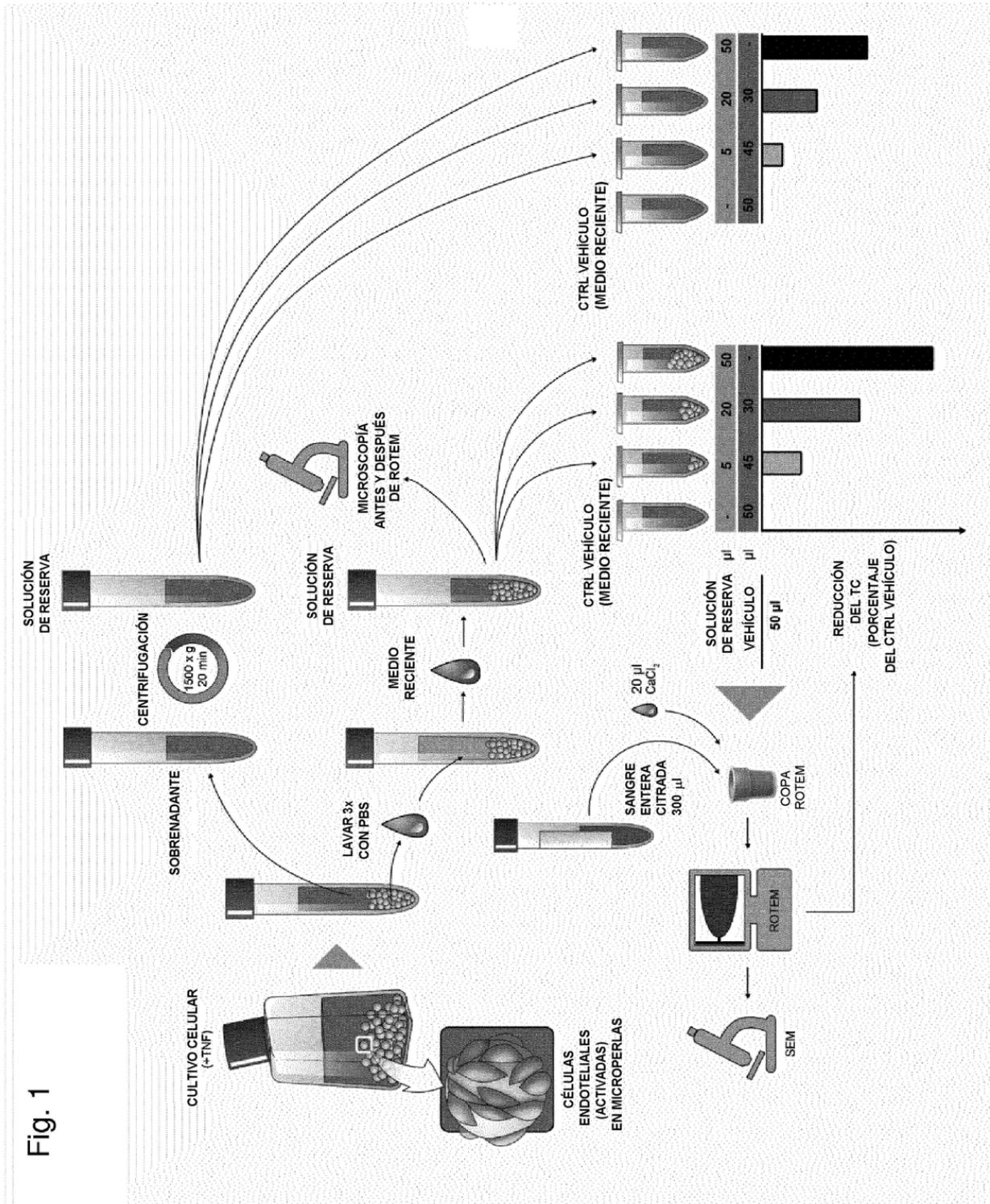


Fig. 2

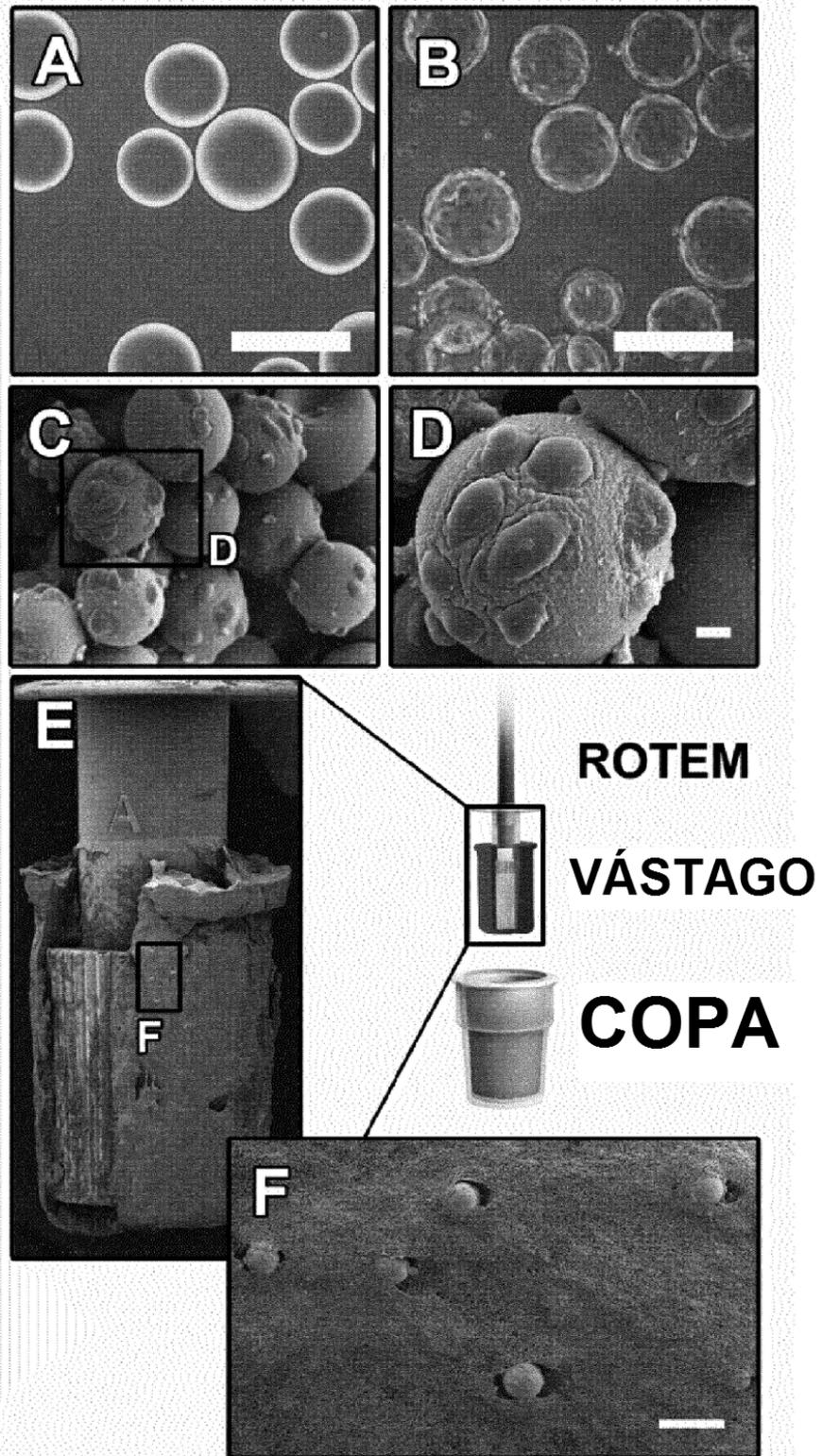


Fig. 3A

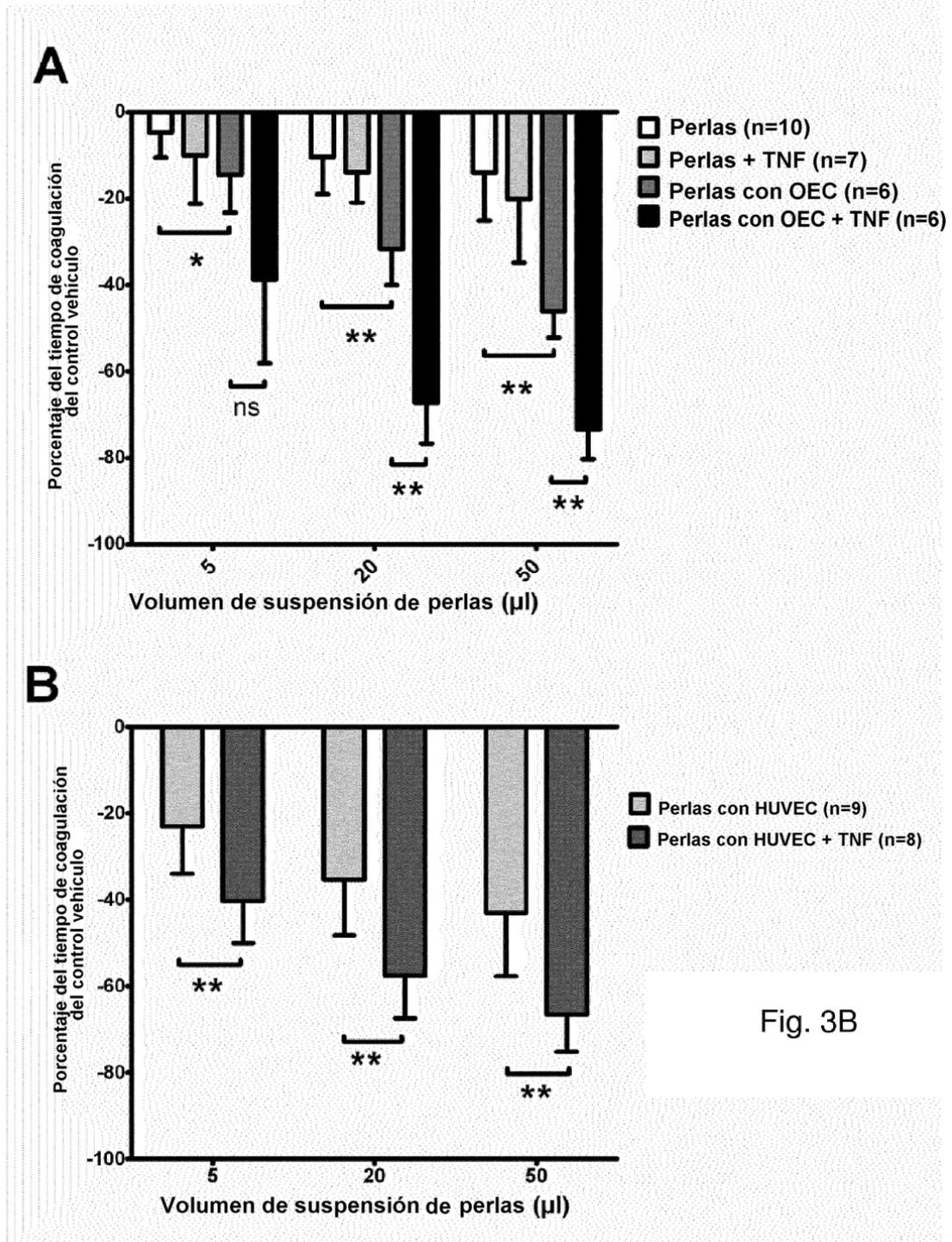


Fig. 3B

Fig. 4

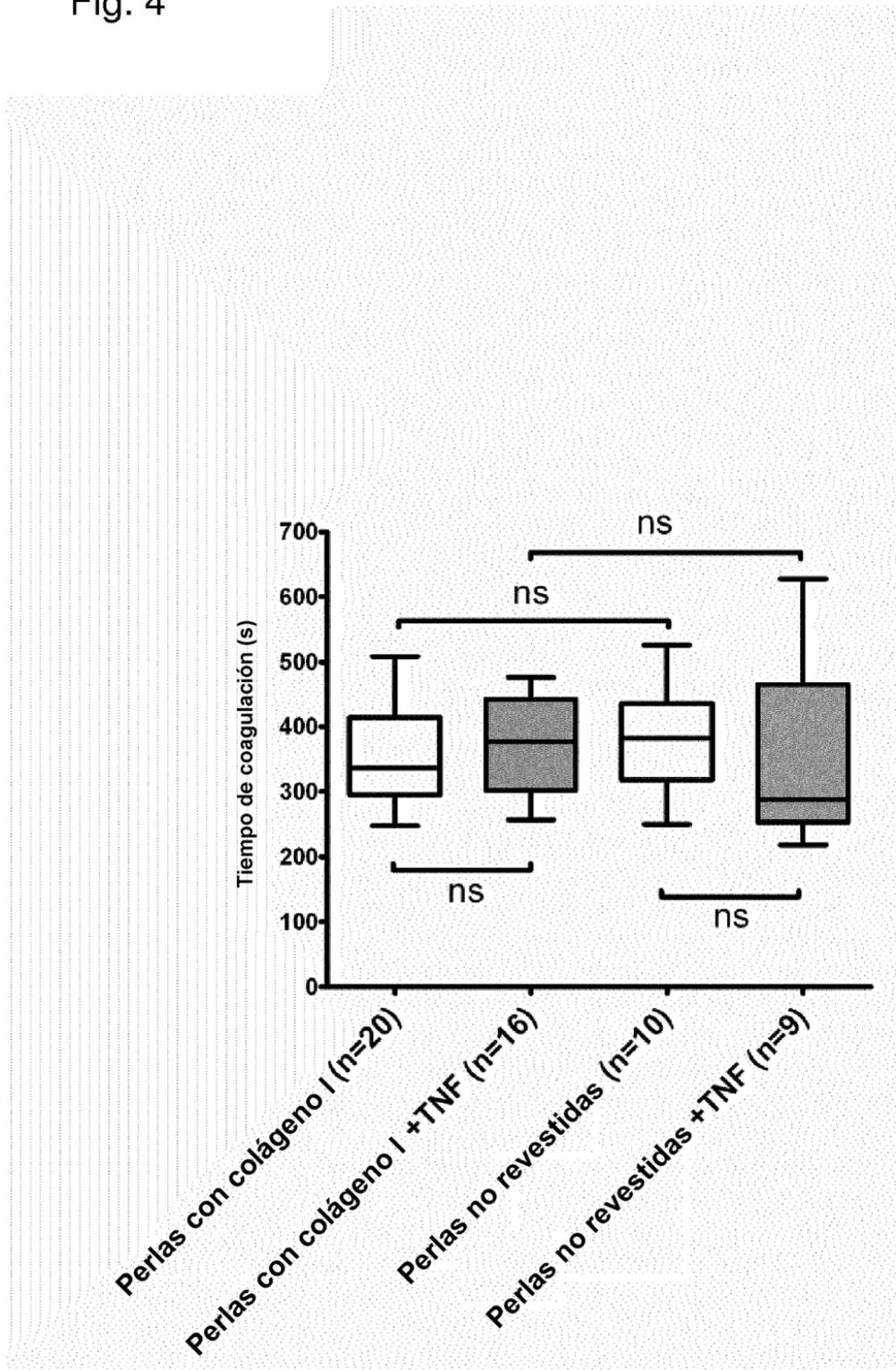


Fig. 5A

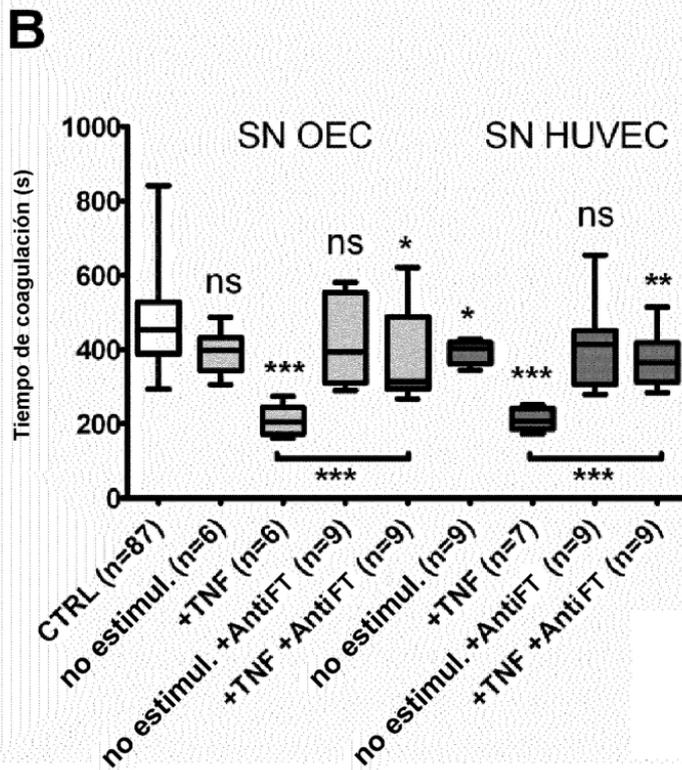
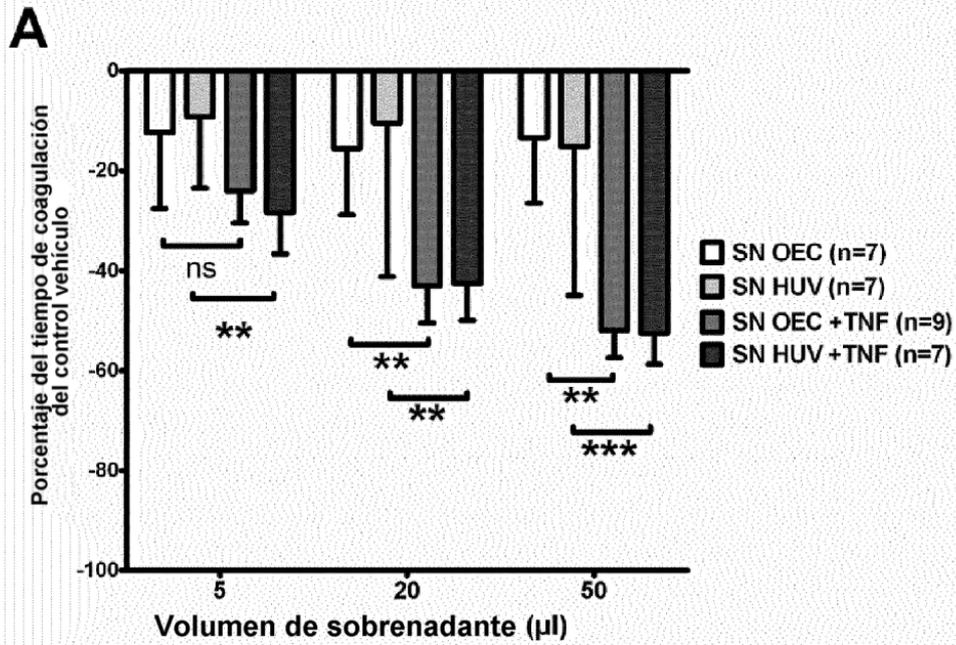


Fig. 5B