



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL PROCESO DE HEMOSTASIA EN
MODELOS MURINOS DE LA TELANGIECTASIA
HEMORRÁGICA HEREDITARIA**

Mención “Doctorado Internacional”

Cristina Egido Turrión

Salamanca, noviembre 2019

EL DOCTOR **D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO**, COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO “BIOCIENCIAS: BIOLOGÍA Y CLÍNICA DEL CÁNCER Y MEDICINA TRASLACIONAL” DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA

Que el presente trabajo, elaborado por **Dña. Cristina Egidio Turrión** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “**Estudio del proceso de hemostasia en modelos murinos de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria**”, ha sido realizado bajo la dirección del Dr D. Miguel Pericacho Bustos, en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido y firmo el presente certificado, en

Salamanca, a de octubre de 2019.

Dr. D. Rogelio González Sarmiento

EL DOCTOR **D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN**, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA

Que el presente trabajo, elaborado por Dña. **Cristina Egido Turrión** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “**Estudio del proceso de hemostasia en modelos murinos de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria**” Ha sido realizado bajo la dirección del Doctor D. Miguel Pericacho Bustos, en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expido y firmo el presente certificado, en

Salamanca a de octubre de 2019.

Dr. D. José Juan García Marín

EL DOCTOR **D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA

Que el presente trabajo, titulado “**Estudio del proceso de hemostasia en modelos murinos de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria**”, presentado por **Dña. Cristina Egido Turrión** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y creyendo que cumple las condiciones necesarias, lo consideran finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado, en
Salamanca, a de octubre de 2019.

Dr. D. Miguel Pericacho Bustos

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con la
Ayuda para la investigación de
la Fundación Miguel Casado San José



ÍNDICE

“Por grande que sean las maravillas de la naturaleza,
hay siempre razones físicas que pueden explicarlas”

VIAJE AL CENTRO DE LA TIERRA

Jules Verne

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS Y GLOSARIO	XIII
SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	XV
GLOSARIO	XX
INTRODUCCIÓN.....	3
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA	5
1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y SÍNTOMAS	5
1.1. MALFORMACIONES VASCULARES.....	6
Malformaciones arteriovenosas pulmonares.....	7
Malformaciones arteriovenosas gastrointestinales	7
Malformaciones arteriovenosas hepáticas	7
Malformaciones arteriovenosas del sistema nervioso.....	8
1.2. HEMORRAGIAS	8
Epistaxis	8
Sangrados gastrointestinales.....	9
1.3. ANEMIA FERROPÉNICA CRÓNICA.....	9
2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE CURAÇAO	10
3. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE HHT	12
4. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF-β.....	14
4.1. SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR	15
4.1.1. Los receptores de TGF- β de tipo I o ALK.....	16
4.1.2. Los receptores de TGF- β de tipo II	19
4.1.3. Los receptores de TGF- β de tipo III.....	19
4.2. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE TGF- β EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES	24

5. BASES MOLECULARES DE LA SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	26
5.1. DESARROLLO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS	28
5.2. ORIGEN DE LOS SANGRADOS.....	29
6. FISIOLÓGÍA DE LA HEMOSTASIA	30
A. FASES DE LA HEMOSTASIA.....	31
6.1. ESPASMO VASCULAR.....	31
6.2. HEMOSTASIA PRIMARIA.....	31
6.2.1. Adhesión plaquetaria	32
6.2.2. Activación plaquetaria	33
6.2.3. Secreción plaquetaria.....	34
6.2.4. Agregación plaquetaria.....	36
6.3. HEMOSTASIA SECUNDARIA Y SISTEMA DE LA COAGULACIÓN	37
6.3.1. Iniciación de la coagulación.....	38
6.3.2. Amplificación de la concentración de trombina	39
6.3.3. Propagación y estabilización del coagulo.....	40
6.4. FIBRINOLISIS	41
B. PAPEL DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DE LA HEMOSTASIA..	44
7. LA HEMOSTASIA EN LA HHT.....	46
8. TRATAMIENTOS ACTUALES DE LA HHT	48
8.1. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES MUCOCUTÁNEAS Y SANGRADOS NASALES.....	49
8.2. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES Y LOS SANGRADOS GASTROINTESTINALES.....	52
8.3. TRATAMIENTO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS PULMONARES	53
8.4. TRATAMIENTO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS HEPÁTICAS.....	53
8.5. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CEREBRALES.....	53
9. CALIDAD DE VIDA DE LOS PACIENTES	54
9.1. IMPLICACIÓN DE LAS HEMORRAGIAS EN LA VIDA DE LOS PACIENTES.....	54
9.2. IMPLICACIÓN DE LAS MAV EN LA ESPERANZA DE VIDA.....	55

HIPÓTESIS.....	57
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS E HIPÓTESIS	59
OBJETIVOS	63
OBJETIVO GENERAL.....	65
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
MATERIALES.....	69
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	69
1.1. MODELO DE RATÓN HHT1. RATONES DEFICIENTES EN ENDOGLINA (<i>Eng</i> ^{+/+}).....	70
1.2. MODELO DE RATÓN HHT2. RATONES DEFICIENTES EN <i>Alk7</i> ^{+/+}	71
1.3. RATONES QUE SOBREENPRESAN ENDOGLINA HUMANA (<i>ENG</i> ⁺)....	71
1.4. MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES	72
1.5. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS ANIMALES.....	73
2. TÉCNICAS GENERALES DE MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	74
2.1. ANESTESIA DE LOS ANIMALES.....	74
2.2. EXTRACCIONES DE SANGRE.....	74
2.2.1. Anticoagulantes utilizados	74
2.2.2.Extracción de sangre a través del corazón	77
2.2.3.Extracción de sangre del plexo retroorbital	78
2.2.4. Extracción de muestras de sangre de la vena yugular	79
2.3. ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS.....	80
2.3.1. Administración intravenosa de agentes procoagulantes a través de la vena yugular.	80
2.3.2.Administración local de cloruro férrico en la superficie de la arteria carótida	81
2.3.3.Administración subcutánea de analgésicos.....	82
2.4. EUTANASIA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	82
3. EXPERIMENTOS REALIZADOS <i>IN VIVO</i>	83
3.1. TIEMPO DE SANGRADO.....	83
3.2. TROMBOGÉNESIS SISTÉMICA AGUDA INDUCIDA POR COLÁGENO Y EPINEFRINA.....	85
3.2.1. Estudio trombocitopenia inducida.....	86

3.2.2. Estudio de los componentes principales de la fibrinólisis.....	87
3.3. ESTUDIO DE LA TROMBOSIS LOCAL INDUCIDA POR CLORURO FÉRRICO	88
Procedimiento.....	88
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES <i>EX VIVO</i>.....	90
4.1. CAPACIDAD VASOCONSTRICTORA DE ANILLOS DE AORTA.....	90
4.1.1. Respuesta contráctil no dependiente de receptores.....	91
4.1.2. Curvas concentración-respuesta a agentes vasoconstrictores.....	91
4.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ENDOTELIALES PROCEDENTES DE PULMÓN DE RATÓN (MLEC).....	92
4.1. Obtención de las líneas celulares de cultivo primario.....	93
4.2. Selección negativa. Retirada de eritrocitos y macrófagos.....	93
4.3. Selección positiva. Aislamiento de células endoteliales.....	94
4.4. Mantenimientos de líneas celulares MLEC.....	95
5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i>.....	97
5.1. FUNCIÓN PLAQUETARIA, CAPACIDAD DE ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN	97
5.1.1. Ensayo de activación plaquetaria.....	97
5.1.2. Agregación plaquetaria.....	97
5.2. ADHESIÓN DE PLAQUETAS A CÉLULAS ENDOTELIALES	100
5.2.1. Experimento estático de adhesión de plaquetas.....	101
5.2.2. Experimento dinámico de adhesión de plaquetas.....	101
6. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PROTEÍNAS	102
TÉCNICA DE ELISA.....	102
7. TRATAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
8. INFORMACIÓN DE ANTICUERPOS, REACTIVOS, SOLUCIONES, MATERIAL, EQUIPO Y SOFTWARE.....	104
ANTICUERPOS	104
REACTIVOS Y PRODUCTOS	105
SOLUCIONES ESPECÍFICAS.....	107
MATERIAL.....	108
EQUIPO Y SOFTWARE	109

RESULTADOS.....113

1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MODELOS DE RATÓN A UNA HEMORRAGIA	115
2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HEMOSTASIA.....	118
2.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA RESPUESTA VASOCONSTRICTORA ARTERIAL.....	119
2.2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HEMOSTASIA PRIMARIA	120
2.2.1. Análisis <i>in vivo</i> de la respuesta plaquetaria a un estímulo protrombótico sistémico y agudo	121
2.2.2. Estudio <i>in vitro</i> de la funcionalidad plaquetaria	122
2.3. ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA FIBRINÓLISIS	123
2.4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO.....	125
2.4.1. Análisis de la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales procedentes de cultivo primario de ratones <i>Eng^{+/-}</i>	126
2.4.2. Estudio <i>in vivo</i> de la estabilización del trombo	128
3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO EN RATONES CON SOBREENPRESIÓN DE ENDOGLINA	129
3.1. ESTUDIO DE RESPUESTAS GENERALES HEMOSTÁTICAS.....	133
3.1.1. Estudios de tiempo de sangrado en ratones con sobreexpresión de endoglina	133
3.1.2. Análisis <i>in vivo</i> de la respuesta plaquetaria frente a un estímulo protrombótico	133
4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ALK1 SOBRE LA HEMOSTASIA	135
4.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ALK1 SOBRE LA RESPUESTA VASOCONSTRICTORA ARTERIAL.....	135
4.2. ESTUDIO DE HEMOSTASIA PRIMARIA EN RATONES DEFICIENTES EN <i>Alk1</i>	137
4.2.1. Análisis <i>in vivo</i> de la respuesta plaquetaria a un estímulo protrombótico sistémico y agudo	137
4.2.2. Estudio <i>in vitro</i> de la funcionalidad plaquetaria	138
4.3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE <i>ALK1</i> EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO.....	140

4.3.1. Análisis de la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales procedentes de cultivo primario de ratones <i>Alk1^{+/-}</i>	140
4.3.2. Estudio <i>in vivo</i> de la estabilización del trombo en ratones <i>Alk1^{+/-}</i>	142
4.4. ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL PROCESO DE FIBRINÓLISIS	142
DISCUSIÓN	147
1. LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA ALTERA LA ADHESIÓN PLAQUETA ENDOTELIO Y DEBILITA LA ESTABILIDAD DEL TROMBO.....	152
1.1. ENDOGLINA PARTICIPA EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO....	155
1.2. EL RIESGO DE TROMBOSIS EN LA HHT COMO CONSECUENCIA DE UNA MENOR ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO	157
2. LOS RATONES DEFICIENTES EN ALK1 PRESENTAN ALTERACIONES EN LA FIBRINOLISIS	158
3. MODELO PROPUESTO	165
A. ALTERACIONES DE ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO EN LOS RATONES <i>Alk1^{+/-}</i>	167
B. ALTERACIONES DEL PROCESO DE FIBRINOLISIS EN LOS RATONES <i>Eng^{+/-}</i>	168
4. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	169
CONCLUSIONS	173
CONCLUSIONS.....	175
BIBLIOGRAFÍA.....	179
SUMMARY	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Manifestaciones clínicas vasculares en la HHT.	6
Figura 2. Ruta de señalización de TGF- β	16
Figura 3. Estructura proteica de ALK1.....	18
Figura 4. Estructura molecular del dímero de endoglina.....	20
Figura 5. Dominio intracelular de endoglina.	24
Figura 6. Señalización intracelular de ALK5 y ALK1.....	26
Figura 7. Interacciones que facilitan la adhesión plaquetaria.	33
Figura 8. Contenido de los gránulos alfa y cuerpos densos de plaquetas.	35
Figura 9. Cascada de la coagulación	38
Figura 10. Formación de los polímeros de fibrina	40
Figura 11. Cascada de la fibrinólisis.....	42
Figura 12. Diseño del constructo vectorizado para la generación de ratones deficientes en endoglina	70
Figura 13. Constructo para la generación de ratones <i>Alk1</i> ^{+/-}	71
Figura 14. Construcción genética para la generación de ratones <i>ENG</i> ⁺	72
Figura 15. Molécula química del citrato sódico y EDTA	75
Figura 16. Estructura del pentasacarido de la heparina y su mecanismo de acción	77
Figura 17. Procedimiento experimental de extracción de sangre intracardiaca	78
Figura 18. Procedimiento para extracción de sangre en el plexo retroorbital por capilaridad	79
Figura 19. Procedimiento para la extracción de sangre a partir de la vena yugular	80
Figura 20. Procedimiento y patrón de sangrado.	84
Figura 21. Conceptos de tiempos de sangrado	85
Figura 22. Inducción de un evento trombótico por administración de colágeno y epinefrina	87
Figura 23. Esquema de la colocación de la sonda	88
Figura 24. Ejemplo de gráfica de registro.....	90
Figura 25. Análisis microscópico de una monocapa de células MLEC confluentes	96
Figura 26. Antígenos plaquetarios reconocidos por los anticuerpos utilizados en los ensayos in vitro de activación.....	98
Figura 27. Análisis de las poblaciones de plaquetas obtenidas por citometría de flujo	99
Figura 28. Análisis de las poblaciones de agregados plaquetarios mediante citometría de flujo.....	100
Figura 29. Ratones modelo de HHT1, HHT2 y sus grupos control	115
Figura 30. Tiempo total de sangrado.....	116
Figura 31. Patrón de sangrado de los ratones <i>Eng</i> ^{+/-} y <i>Alk1</i> ^{+/-}	117
Figura 32. Ratones que tienen resangrados de más de 2 minutos	118
Figura 33. Análisis de la contracción de anillos de aorta procedentes de ratones <i>Eng</i> ^{+/-}	119
Figura 34. Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en el modelo de ratón <i>Eng</i> ^{+/-}	121
Figura 35. Estudio <i>in vitro</i> de la activación y agregación de plaquetas procedentes de ratones <i>Eng</i> ^{+/-}	122

Figura 36.	Análisis de la concentración plasmática de los principales componentes de la fibrinólisis en ratones <i>Eng</i> ^{+/-}	124
Figura 37.	Estudio de la adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales de cultivo primario de ratones <i>Eng</i> ^{+/-}	127
Figura 38.	Estudio local del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones <i>Eng</i> ^{+/-}	129
Figura 39.	Ratones con sobreexpresión de endoglina humana y ratones <i>wild type</i> utilizados como grupo control.....	130
Figura 40.	Estudio de adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales que sobreexpresan endoglina.....	131
Figura 41.	Estudio del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones que sobreexpresan <i>ENG</i>	132
Figura 42.	Tiempo sangrado total de ratones que sobreexpresan <i>ENG</i>	133
Figura 43.	Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en ratones con sobreexpresión de <i>ENG</i>	134
Figura 44.	Análisis de la contracción de anillos de aorta procedentes de ratones <i>Alk1</i> ^{+/-}	136
Figura 45.	Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en el modelo de ratón <i>Alk1</i> ^{+/-}	137
Figura 46.	Estudio <i>in vitro</i> de la activación y agregación de plaquetas procedentes de ratones modelo de <i>Alk1</i> ^{+/-}	139
Figura 47.	Estudio de la adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales de cultivo primario de ratones <i>Alk1</i> ^{+/-}	141
Figura 48.	Estudio del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones <i>Alk1</i> ^{+/-}	142
Figura 49.	Análisis de la concentración plasmática de los principales componentes de la fibrinólisis en ratones <i>Alk1</i> ^{+/-}	144
Figura 50.	Esquema representativo de la adhesión de plaquetas a células endoteliales.....	157
Figura 51.	Esquema simplificado de la relación entre los niveles de t-PA y PAI-1 tras la inducción de la trombosis en una situación fisiológica y en los ratones heterocigotos <i>Alk1</i> ^{+/-}	161
Figura 52.	Esquema de la cascada de la fibrinólisis en una situación fisiológica y en ausencia de <i>Alk1</i>	162
Figura 53.	Esquema resumen de la patogenia de los sangrados severos en la HHT.....	166
Figure 1.	Bleeding time or total bleeding time.....	223
Figure 2.	First bleeding time and (total) rebleeding time.....	224
Figure 3.	Study of platelet function.....	225
Figure 4.	Study of thrombus stabilization.....	228
Figure 5.	Analysis of plasma concentration of the main components of fibrinolysis system in <i>Alk1</i> ^{+/-} mice.....	230
Figure 6	233

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los criterios de Curaçao para el diagnóstico de pacientes de HHT11	
Tabla 2. Genes afectados en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria....	13
Tabla 3. Tratamientos de las lesiones mucocutáneas	51
Tabla 4. Cebadores utilizados para el genotipado de los ratones.....	73
Tabla 5. Kits comerciales de ELISA utilizados en este trabajo	102
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en este trabajo	104
Tabla 7. Reactivos y productos utilizados en este trabajo	105
Tabla 8. Soluciones utilizadas.....	107
Tabla 9. Material utilizado.....	108
Tabla 10. Equipo utilizado en este trabajo.....	109
Tabla 11. Software utilizado.....	110



ABREVIATURAS Y GLOSARIO

がんばる 頑張る - **GANBARU** - TÉRMINO JAPONES

La virtud del esfuerzo,
la perseverancia y la superación

SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Con el fin de no entorpecer la lectura se ha tratado de evitar la utilización términos abreviados. No obstante, en determinados contextos ha sido necesario el uso de acrónimos, siglas y abreviaturas acuñados del área de conocimiento científico.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO / TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL
5-HT	<i>5-hydroxytryptamine o serotonin</i> 5-hidroxitriptamina o serotonina
A2AP	<i>Alpha 2-antiplasmin</i> Antiplasmina α 2
ACVRL1	<i>Activin receptor-like kinase 1</i> Quinasa similar al receptor de activina Tipo I
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin 5'-diphosfato
ALK1	<i>Activin receptor-like kinase 1</i> Quinasa similar a activina Tipo I
ALK5	<i>Activin receptor-like kinase 5</i> Quinasa similar a activina 5
AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i> Asociación Médica de Veterinaria Americana
BMP9	<i>Bone Morphogenetic Protein 9</i> Proteína morfogénica ósea 9

BMPRII	<i>Bone morphogenetic protein receptor type II</i> Receptor de BMP tipo II
BOEC	<i>Blood Outgrowth Endothelial Cell</i> Células endoteliales excrecencia de sangre
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> Albúmina de suero bovino
CVM	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> Virus mosaico de la coliflor
D2D	Dímero-D
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfoxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i> Suplemento de crecimiento de células endoteliales
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error Estándar de la media
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cell</i> Células Progenitoras Endoteliales
FDP	<i>Fibrin Degradation Products</i> Productos de Degradación de la Fibrina
FeCl₃	Cloruro férrico
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

Factor de Crecimiento de Fibroblastos

GDF2 *Growth / Differentiation factor 2*

Factor de Crecimiento y Diferenciación 2

GI Gastrointestinal

GP Glicoproteína

HEPES Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(2-etanesulfónico)

HHT *Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia*

Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

HHT-ESS *HHT - Epistaxis Severity Score*

Valoración de la gravedad de las epistaxis en HHT

HTJP *Juvenile polyposis / hereditary haemorrhagic telangiectasia syndrome*

Síndrome combinado de HHT y poliposis juvenil

HUVEC *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

Células madre del cordón umbilical

KO *Knockout mouse*

Ratón al que se le ha eliminado la expresión de ambas copias del gen

KPSS *High potassium Physiological Saline Solution*

Solución de suero fisiológico con alto contenido en potasio

MAV Malformaciones Arteriovenosas

MEC Matriz extracelular

MLEC *Mice Lung Endothelial Cells*

Células endoteliales procedentes de pulmón

PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PLAT	<i>Tissue-type Plasminogen Activator (gene)</i> Activador tisular del plaminógeno (gen)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa
PECAM	Molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial <i>Platelet Endothelial Cell Adhesión Molecule</i>
PIPES	<i>Piperazinediethanesulfonic acid</i> Ácido piperazina bis-etanosulfónico
SEA	Servicio de Experimentación Animal
Serpin	<i>Serin protease inhibitor</i> Inhibidor de serina proteasa
Smad	<i>Small protein Mothers Against Decapentaplegic</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> Barrera libre de patógenos
t-PA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i> Activador tisular del plaminógeno
TβRII	<i>TGF-β receptor type II</i> Receptor tipo II de TGF-β
TAFI	<i>Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i> Inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina
TF	Factor Tisular <i>Tissue Factor</i>

TFPI	Inhibidor de la vía del Factor Tisular <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i> Factor de crecimiento transformante beta
TXA	<i>Tranexamic acid</i> Ácido tranexámico
u-PA	<i>urokinase-type Plasminogen Activator</i> Activador del plasminógeno tipo uriquinasa
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Factor de crecimiento endotelial vascular
vWF	Factor de von Willebran <i>von Willebran Factor</i>
WT	<i>Wild Type</i> Genotipo salvaje
ZP (Dominio)	Dominio Zona Pelúcida

GLOSARIO

TÉRMINO		DEFINICIÓN
<i>Beads</i>	(ingl.)	Pequeñas bolas recubiertas de anticuerpo
<i>Bleeding Time</i>	(ingl.)	Tiempo de sangrado
<i>Bolus IV</i>	(lat. cient.)	Administración intravenosa rápida de una sustancia
<i>Buffer</i>	(ingl.)	Solución tamponada
<i>Cassette</i>	(ingl.)	Secuencia génica diseñada para modificar genéticamente un organismo
<i>Cluster of differentiation</i>	(ingl.)	Moléculas situadas en la superficie celular que sirven como marcadores
<i>Et al.</i>	(lat. cient.)	Abreviatura que significa “y colaboradores”
<i>Ex vivo</i>	(lat. cient.)	Experimentos realizados en tejidos procedentes de un organismo
<i>In vitro</i>	(lat. cient.)	Experimento realizado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo
<i>In vivo</i>	(lat. cient.)	Experimento realizado en un organismo vivo
<i>Locus</i>	(lat. cient.)	Lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN
<i>Splicing</i>	(ingl.)	Proceso transcripcional de corte y empalme de secuencias
<i>Stock</i>	(ingl.)	Solución de almacenamiento con concentración más elevada de la que se parte para generar la solución de trabajo
<i>Washing buffer</i>	(ingl.)	Solución tamponada de lavado
<i>Wildtype</i>	(ingl.)	Genotipo salvaje

*Las abreviaturas en paréntesis indican el origen etimológico de las palabras.

(ingl.) = inglés; (lat.cient.) = latín científico

The background of the entire page is a detailed technical drawing in pencil or light grey. It features various mechanical components, including gears of different sizes, shafts, and rectangular blocks. Dashed lines represent hidden edges, and solid lines represent visible ones. Several dimensions are indicated with arrows and numbers: '22.24' is written vertically on the left side, '26' appears in several locations, and '41.5' is written vertically on the right side. The overall style is that of a precise engineering sketch.

INTRODUCCIÓN

“Somewhere between the bottom of the climb and the summit
is the answer to the mystery we climb.”

Greg Child

TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT, por sus siglas en inglés, *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad genética autosómica dominante, que está clasificada como enfermedad rara por tener una prevalencia de uno por cada 5 000 - 8 000 personas (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003).

La HHT fue descrita por primera vez en 1896 por Henri J. Rendu que reconoció la combinación de los síntomas característicos de la enfermedad, definiéndolos como una entidad específica y distinta de la hemofilia (Rendu, 1896). Durante la siguiente década, William B. Osler y Frederick P. Weber publicaron informes donde describen los síntomas y los etiquetan por primera vez en conjunto como parte de esta enfermedad (Osler, 1901; Weber, 1907). Finalmente, en 1909, Frederic Hanes, acuñó el término “Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria” para designar la enfermedad en reconocimiento a las tres características que por entonces la definían (Hanes, 1909; Guttmacher, Marchuk and White, 1995).

1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y SÍNTOMAS

La HHT se caracteriza por la presencia de múltiples telangiectasias dérmicas, mucosas y viscerales, así como por la aparición de sangrados recurrentes (Sureda *et al.*, 1991). Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de que la enfermedad es genética, autosómica y dominante, el fenotipo de síntomas en los pacientes de HHT es muy variable, incluso entre familiares con la misma mutación, aumentando su número y severidad con la edad.

1.1. MALFORMACIONES VASCULARES

Las lesiones vasculares típicas de la enfermedad son, por una parte, las telangiectasias, que son vasodilataciones de pequeño tamaño, visibles en la superficie cutánea y mucosas. Afectan a un 90% de pacientes, suelen aparecer a partir de la segunda década de vida y tienden a aumentar en número y tamaño con la edad. Frecuentemente se localizan en labios, lengua, paladar, pulpejos de los dedos, área facial, pabellones auriculares y tracto gastrointestinal (GI) (Govani and Shovlin, 2009).

Por otra parte, las malformaciones arteriovenosas (MAV) son comunicaciones anormales directas entre una arteria y una vena. Se consideran una de las manifestaciones más graves de la enfermedad, por las complicaciones que conllevan. Las localizaciones más frecuentes de las MAV son los pulmones (15 - 50%), hígado (5 - 30%), tracto gastrointestinal (20 - 70%) y sistema nervioso (10%) (Cottin *et al.*, 2007; Faughnan *et al.*, 2011; Brinjikji *et al.*, 2017).

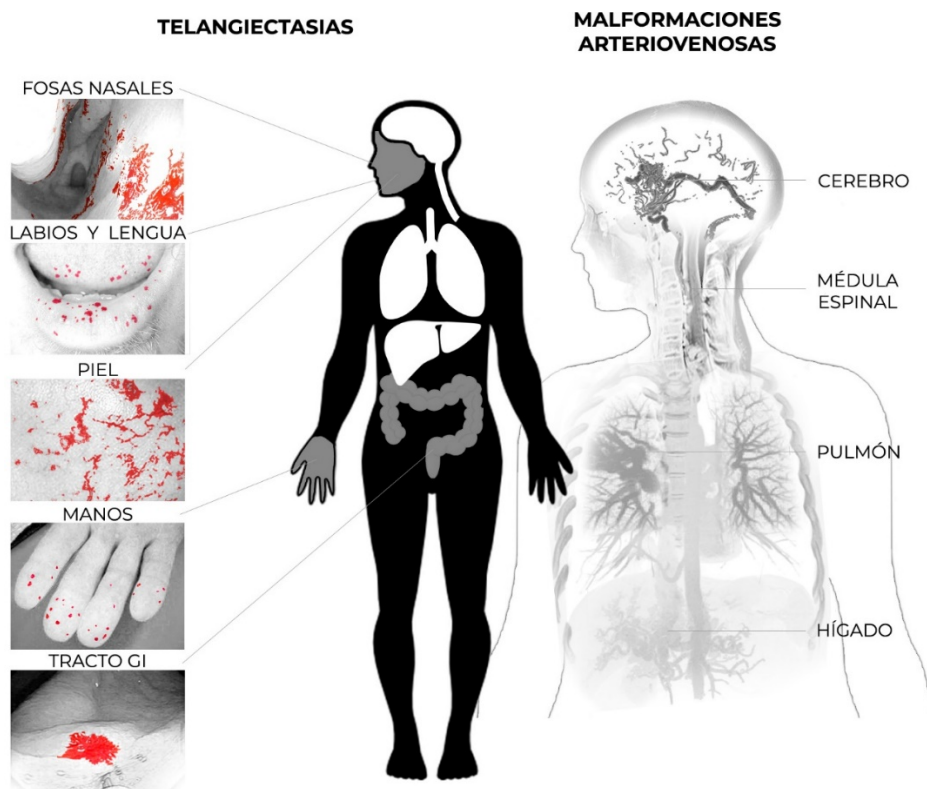


Figura 1. Manifestaciones clínicas vasculares en la HHT.

Malformaciones arteriovenosas pulmonares

Las complicaciones derivadas de estos vasos anómalos varían en función de su tamaño y localización. Así, la comunicación anómala de la circulación pulmonar o la falta de una red capilar aumenta el riesgo de complicaciones en pacientes con MAV pulmonares. Estas complicaciones se manifiestan en forma de tromboembolias paradójicas, hemorragia pulmonar, disnea, hipoxemia, absceso cerebral, ataques isquémicos transitorios, apoplejía e infección musculoesquelética o espinal (Sopeña *et al.*, 2013). Debido a estas complicaciones el riesgo de mortalidad en pacientes con MAV pulmonares es alto debido al mayor riesgo de accidente cerebrovascular, hemorragia pulmonar y abscesos cerebrales y sistémicos (Greben *et al.*, 2013).

Malformaciones arteriovenosas gastrointestinales

Las MAV gastrointestinales a menudo son asintomáticas, aunque pueden contribuir a la anemia ferropénica, debido a las frecuentes y continuas hemorragias digestivas que afectan entre el 13 y el 33 % de los pacientes (Vase and Grove, 1986; Shovlin, 2010). Su detección es difícil, por lo que a los pacientes de HHT que padecen anemia y esta no se justifica por la severidad de las epistaxis se les recomienda la exploración por endoscopia, ya que es probable que la causa se refiera a estas (Peterson, 2017).

Malformaciones arteriovenosas hepáticas

Las malformaciones hepáticas suelen ser asintomáticas, sin embargo, aunque la probabilidad sea baja, se pueden producir afectaciones secundarias al desarrollo de distintos tipos de comunicaciones arteriovenosas o veno-portales que causan la desviación anómala de la sangre y, como consecuencia, la aparición de insuficiencia cardíaca, hipertensión portal y enfermedad biliar (Garcia-Tsao *et al.*, 2000; Peterson, 2017).

Malformaciones arteriovenosas del sistema nervioso

A pesar de que las MAV en el sistema nervioso son menos frecuentes, estas pueden originar patologías más graves como migrañas, ataques epilépticos o paraplejia aguda en caso de afectación medular (Maher *et al.*, 2001; Brinjikji *et al.*, 2017). Además, una de las complicaciones más graves que derivan de las MAV en el sistema nervioso son las hemorragias espontáneas y las lesiones que se ocasionan como consecuencia de ellas (Faughnan *et al.*, 2011).

1.2. HEMORRAGIAS

La rotura de las telangiectasias y malformaciones vasculares provoca la aparición de hemorragias espontáneas y recurrentes (Pau, Carney and Murty, 2001). Dos de los sangrados más característicos de esta enfermedad son las epistaxis, o sangrados nasales, y los sangrados gastrointestinales. La penetrancia, frecuencia e intensidad de estos síntomas es variable y aumentan con la edad (Peterson, 2017).

Epistaxis

Generalmente las epistaxis son el primer síntoma que se manifiesta ya que aparece en edades tempranas (AAssar, Friedman and White, 1991). A los 10 años lo refiere el 46% de los pacientes de HHT, en la segunda década de vida, este porcentaje aumenta al 60 - 70% y a los 40 años, lo padece prácticamente la totalidad de pacientes con HHT (Dheyauldeen, Abdelnoor and Bachmann-Harildstad, 2011).

El número de epistaxis es frecuente, más de un evento a la semana, y aumenta con el transcurso del tiempo. El 12% de los casos diagnosticados tienen más de un sangrado al día, en el periodo de vida activa completa, entre

los 30 - 60 años. A partir de los sesenta años se describen formas más graves y de manejo difícil.

La intensidad de los sangrados puede variar desde unas pocas gotas hasta eventos muy difíciles de detener que llevan a alteraciones hemodinámicas. Los sangrados más graves, con duración de más de 10 minutos, son descritos por el 70% de la población de pacientes de edades comprendidas entre los 45 y los 60 años (Plauchu *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2013).

Sangrados gastrointestinales

A pesar la alta frecuencia de aparición de telangiectasias en el tracto gastrointestinal, sólo el 25% de los afectados desarrollan sangrados gastrointestinales sintomáticos que no suelen percibirse hasta la quinta o sexta década de vida (Parambil, 2016). Sin embargo, se cree que estas cifras son una subestimación, ya que en muchos casos la aparición de melenas en HHT se atribuyen erróneamente a las epistaxis o el paciente no los detecta. Además, debido al difícil acceso y visualización de las lesiones vasculares, el diagnóstico de las hemorragias gastrointestinales es complejo (Kjeldsen and Kjeldsen, 2000). En general, se diagnostican por la presencia de anemia ferropénica que no está justificada por la cuantía de las epistaxis, puesto que los sangrados GI también contribuyen a la aparición de anemia (Vase and Grove, 1986; Jackson *et al.*, 2017).

1.3. ANEMIA FERROPÉNICA CRÓNICA

La presencia de sangrados nasales y gastrointestinales conduce al desarrollo de anemia ferropénica en el 50% de los pacientes (Pahl, Choudhury and Kasthuri, 2016). No solo la alta frecuencia, sino también lo abundantes y prolongados que pueden llegar a ser los sangrados, contribuyen a la aparición de anemia como síntoma secundario a la pérdida constante de sangre (Geisthoff *et al.*, 2015).

La prevención y el tratamiento de la anemia se vuelven primordiales en, al menos, un tercio de los pacientes con HHT (Govani and Shovlin, 2009). Como primera medida, se trata de evitar el origen de la anemia, sin embargo, es muy difícil poder detener las hemorragias en estos pacientes (Geisthoff *et al.*, 2015). En general, el tratamiento consiste en la administración oral o parenteral de hierro. Y en casos en los que existen pérdidas continuas y no controladas de sangre (≥ 60 ml / día) se recomienda la administración repetida de transfusiones de sangre (Weingarten *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2017).

No se dispone de datos globales que cuantifiquen la media de las unidades de sangre que necesitan estos pacientes. Sin embargo, en 1999 se publicó un estudio que trataba de esclarecer las causas de defunción de 36 pacientes HHT. Según el estudio, la enfermedad contribuyó a la defunción del 36% de ellos. De este porcentaje de pacientes, todos necesitaron al menos 6 transfusiones de sangre en los últimos 6 meses de vida, llegando a haber pacientes que necesitaron entre 20-50 y, en un caso, hasta 88 unidades de sangre (Kjeldsen, Vase and Green, 1999).

2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE CURAÇAO

A pesar de que el conjunto de estas manifestaciones clínicas crea un perfil muy característico de la enfermedad, la alta variabilidad en la edad de aparición hace que el diagnóstico sea complejo. Por esta razón, en 1999 se reunió un comité de expertos y, por consenso, desarrollaron una serie de criterios diagnósticos para la enfermedad de HHT denominados criterios de Curaçao. En la actualidad, estos criterios permanecen vigentes y continúan aplicándose en clínica (Shovlin *et al.*, 2000).

Existen cuatro criterios de Curaçao para establecer el diagnóstico de la HHT: epistaxis, telangiectasias, una historia familiar positiva y una alteración visceral confirmada. La combinación de tres de estos criterios da

lugar a un diagnóstico definitivo de la enfermedad, es decir, se confirma que el paciente tiene la enfermedad de HHT. En el caso de que solo se detecten dos de los cuatro criterios, no se confirma el diagnóstico de la enfermedad, se considerará a ese paciente como probable o en sospecha de padecer la HHT. Finalmente, si sólo se cumpliera uno o ninguno de los criterios, no se confirma el diagnóstico de HHT (Tabla 1).

Tabla 1. Los criterios de Curaçao para el diagnóstico de pacientes de HHT

EL DIAGNÓSTICO DE HHT ES:	
Definitivo	Si 3 de los criterios están confirmados
Posible o en sospecha	Si 2 de los criterios están confirmados
Improbable	Si hay menos de dos criterios confirmados
CRITERIOS:	
1. Epistaxis	Espontáneos y recurrentes
2. Telangiectasias	Múltiples y en localizaciones características: Labios, cavidad bucal, dedos y/o nariz
3. Lesiones viscerales	Telangiectasias gastrointestinales (con o sin sangrado), MAV pulmonares, hepáticas, cerebrales o espinales
4. Historia familiar	Un familiar de primer grado con HHT

Para las epistaxis, no existe un consenso sobre el número de eventos y la cuantía, sin embargo, estos siempre deben de ser espontáneos y recurrentes. Existen varias escalas que tratan de evaluar la severidad de los sangrados nasales. La escala de Bergler-Sadick que evalúa frecuencia y cantidad, y más recientemente la escala *HHT Epistaxis Severity Score* (HHT-ESS) que tienen unos criterios más completos y específicos de la enfermedad. Evalúa la frecuencia, duración, intensidad, severidad de la terapia aplicada para

detener los sangrados, aparición de anemia y la necesidad de transfusiones de sangre (Hoag *et al.*, 2010).

En cuanto a las telangiectasias, deben existir al menos tres de estas lesiones para que pueda contar como criterio clínico para el diagnóstico. Además, estas han de aparecer en las zonas características, es decir, labios, mucosas, cavidad bucal, dedos y/o nariz (Shovlin *et al.*, 2000).

La confirmación de una lesión visceral cuenta como criterio diagnóstico, como por ejemplo, telangiectasias gastrointestinales, malformaciones vasculares pulmonares, hepáticas o cerebrales y/o espinales (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003).

Por último, al tratarse de una enfermedad hereditaria autosómica dominante, la penetrancia es alta, por lo que al menos un familiar de primer grado ha de padecer la HHT. Sin embargo, la telangiectasia hemorrágica hereditaria tiene la particularidad de que la penetrancia aumenta con la edad, por lo que puede permanecer silente hasta después de algunas décadas de vida (Guttmacher, Marchuk and White, 1995). Por esta razón, hoy día se trata de llevar a cabo la confirmación por diagnóstico genético (Govani and Shovlin, 2010).

3. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES DE HHT

Más del noventa por ciento de los pacientes que cumplen los criterios clínicos de Curaçao tienen mutaciones en alguno de los seis *locus* genéticos que están descritos como causa de la HHT (Chung, 2015). Estos pacientes se clasifican en seis subtipos de HHT que se basan en las mutaciones genéticas del paciente, ver [Tabla 2](#).

Tabla 2. Genes afectados en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.

Tipo de HHT	Núm. OMIN	Locus	Gen	Proteína
HHT1	#187300	9q33-34	<i>ENG</i>	endogлина
HHT2	#600376	12q11-14	<i>ACVRL1</i>	ALK1
HHT3	%601101	5q31.3-32?	Desconocido	-
HHT4	%610655	7p14?	Desconocido	-
HTJP	#175050	18q21.2	<i>MADH4</i>	Smad4
HHT5	#605120	10q11.22	<i>GDF2/BMP9</i>	GDF2/BMP9

En primer lugar, mutaciones en el gen *ENG*, que codifica la proteína endogлина, conducen al subtipo 1 (HHT1) de la enfermedad. Este subgrupo comprende el 61% de la población de pacientes (McDonald *et al.*, 1994; Shovlin *et al.*, 1994). Los pacientes del subtipo HHT2 (37%), tienen mutaciones en el gen *ACVRL1* (por sus siglas en inglés, *activin A receptor-like kinase 1*) que codifica la proteína ALK1 (por sus siglas en inglés, *Activin receptor-like kinase 1*) (Johnson *et al.*, 1995). Ambas, endogлина y ALK1, son proteínas de membrana y parte de la familia de receptores del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor beta*) (Kühnel *et al.*, 2018).

Menos frecuente (2%) es la forma combinada de poliposis juvenil con HHT (HTJP, por sus siglas en inglés *Juvenile polyposis / hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome*), que cursa con mutaciones en el gen *MADH4* que codifica la proteína Smad4. Esta proteína también forma parte de la ruta de señalización de TGF- β y regula las respuestas de transcripción de TGF- β y BMP (Chung, 2015).

Por último, se ha postulado que existen otros tres *locus* afectados. Estudios de vinculación genómica y familiar han identificado mutaciones de genes en la región 31.3-32 del brazo largo del cromosoma 5 (HHT3) (Cole *et al.*, 2005) y en la región 14 del brazo corto del cromosoma 7 (HHT4), no obstante, aún se desconocen las proteínas afectadas y su papel molecular

(Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006; Kühnel *et al.*, 2018). Más recientemente, se descubrió en pacientes con HHT una mutación en el factor de crecimiento y diferenciación 2 (GDF2, por sus siglas en inglés *Growth/Differentiation Factor 2*) también conocido como la proteína morfogénica ósea 9 (BMP9, por sus siglas en inglés *Bone Morphogenic Protein 9*) (Wooderchak-Donahue *et al.*, 2013). A estos pacientes se les clasifica en un nuevo subtipo de la enfermedad, el subgrupo HHT5 (Chung, 2015).

Todos estos genes responsables de la aparición de la enfermedad de HHT tienen en común que codifican proteínas que participan en la vía de señalización de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (Govani and Shovlin, 2009).

4. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF- β

La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β , comprende no sólo los TGF- β (1-3), sino también las BMP o las activinas, entre otras citoquinas. Estos factores están implicados en numerosos procesos celulares como el fomento del crecimiento, desarrollo de tejidos en el embrión y, en tejidos maduros, participa en la homeostasis del organismo. Además, están relacionados con la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, en procesos involucrados en la reparación tisular, en la angiogénesis, en la vasculogénesis y en la respuesta inmune, entre otros (Massagué, 2006; ten Dijke and Arthur, 2007; Cai *et al.*, 2012).

4.1. SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR

Las citoquinas de la superfamilia de TGF- β transmiten sus señales al interior de la célula a través de receptores de membrana de tipo serina-treonina-kinasa que constituyen el complejo de receptores de TGF- β . Atendiendo a sus propiedades estructurales y funcionales, los receptores se han dividido en tres subfamilias, denominadas receptores de tipo I, tipo II y tipo III (Miyazawa *et al.*, 2002; Derynck and Zhang, 2003). TGF- β se une y aproxima los receptores en la superficie celular formando complejos diméricos de receptores, es decir, complejos de dos pares de subunidades de tipo I y de tipo II (Derynck, 1994). Por su parte, los receptores de tipo III, son proteoglicanos anclados a la membrana que tienen función de presentación de los receptores de tipo I y II y ayudan a modular la señalización intracelular (Massagué, 1998, 2006).

La unión de TGF- β al receptor de tipo II, y consecutivamente al tipo I, lleva a la formación del complejo de receptores y al inicio de la fosforilación en cascada, o señalización intracelular, que lleva a la transmisión de la señal hasta el núcleo, a través de la familia de las Smad, donde se regulan la transcripción de los genes diana (Shi and Massagué, 2003), ver [Figura 2](#).

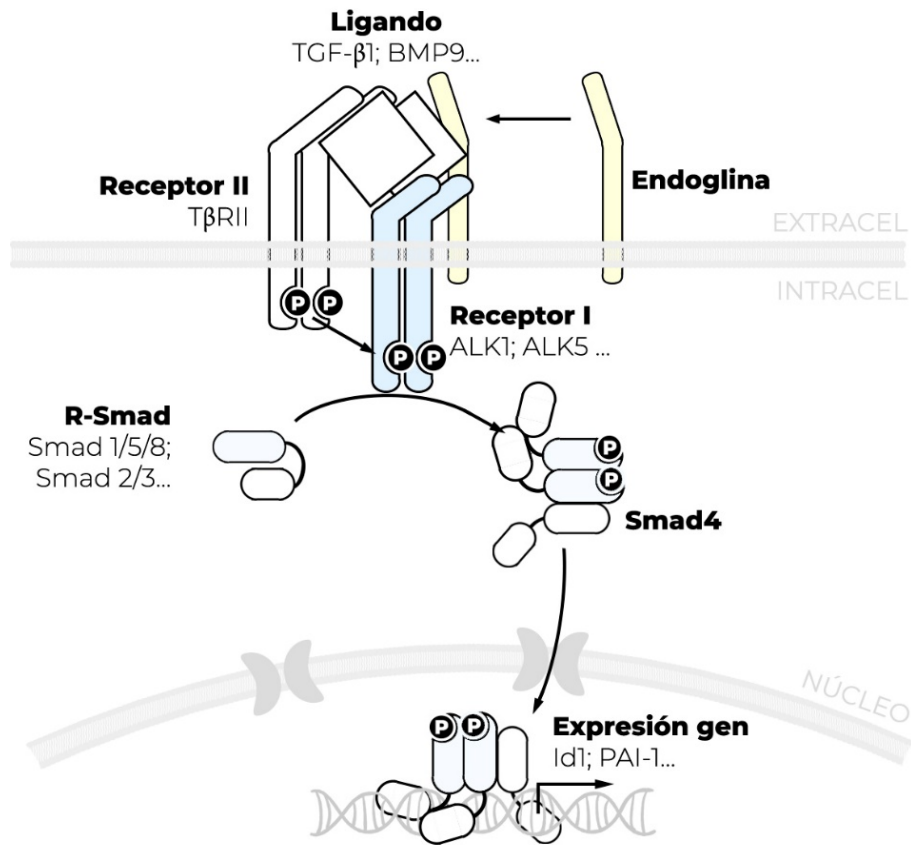


Figura 2. Ruta de señalización de TGF-β. El factor de crecimiento se une al receptor de tipo II, recluta al receptor de tipo I y lo fosforila. El receptor I fosforila a la R-Smad que se une a Smad4 y se traslada al núcleo donde actúan como factores de transcripción. Adaptado de (Roman and Hinck, 2017).

4.1.1. Los receptores de TGF-β de tipo I o ALK

Existen siete receptores de tipo I, denominados ALK 1-7, que a su vez pueden ser divididos en dos subgrupos. El criterio para la división está basado en su afinidad por el ligando al que se unen y las R-Smads que activan. Así, los receptores de tipo I; ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 se unen principalmente a BMP y activan las R-Smads 1, 5 y 8, mientras que ALK4, ALK5 y ALK7 se unen a ligandos como activinas, miostatina y los TGF-β y activan R-Smads 2 y 3. Cada R-Smad ensambla con distintos complejos transcripcionales que se dirigen a distintos genes (Massague and Wotton, 2000).

La proteína ALK1

ALK1 o Quinasa similar al receptor de activina Tipo I (por sus siglas en inglés, *Activin receptor-like kinase 1*) es una proteína homodimérica transmembrana. Su nombre lo adquirió por su similitud con el receptor tipo II de activina, caracterizado a partir de células endoteliales de cordón umbilical humano (ten Dijke *et al.*, 1993).

El gen que codifica la expresión de ALK1 se denomina *ACVRL1* y se sitúa en el brazo largo del cromosoma 12 (12q11-q14) (Berg *et al.*, 1997). Tiene una alta expresión en células endoteliales y tejidos muy vascularizados, como placenta y pulmón (Johnson *et al.*, 1996), y aumenta durante los periodos de angiogénesis activa, durante la reparación de heridas, reparación de tejidos y en la angiogénesis tumoral (Seki, Yun and Oh, 2003; Mahmoud *et al.*, 2009). Además de su mayoritaria expresión en el endotelio, también se ha descrito que ALK1 se expresa en células esteladas hepáticas (Wiercinska *et al.*, 2006), cardiomiocitos (Su *et al.*, 2004), condrocitos (Finsson *et al.*, 2008), monocitos (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004), células madre de la cresta neural (Mancini *et al.*, 2007), fibroblastos de piel (Beger *et al.*, 2006), microglía (König *et al.*, 2005) y mioblastos (Velasco *et al.*, 2008).

Estructura de ALK1

Es una proteína de 55-65 kDa que consta de 503 aminoácidos y que puede dividirse en cuatro regiones. En primer lugar, un pequeño péptido señal en el extremo amino-terminal de su dominio extracelular, que se elimina durante su procesamiento para generar la proteína madura. A continuación, una zona rica en cisteínas y en glicosilaciones de los grupos amino de las cadenas laterales de asparraginas y glutaminas, importantes para la unión con el ligando. Seguidamente, un segmento transmembrana y una región citoplasmática de 30 aminoácidos, denominado “región GS” localizada inmediatamente por encima del dominio quinasa de estos receptores, que contiene un dominio rico en glicina y serina (denominado subdominio GS)

muy conservado en todos los receptores de tipo I, y que posee una función importante en la regulación de la actividad quinasa. Por último, el subdominio serina/treonina (Ser/Thr) quinasa de estos receptores que confiere a estos receptores la capacidad de fosforilación que permite transmitir la señal, ver [Figura 3](#) (Mahlawat *et al.*, 2012; Townson *et al.*, 2012).

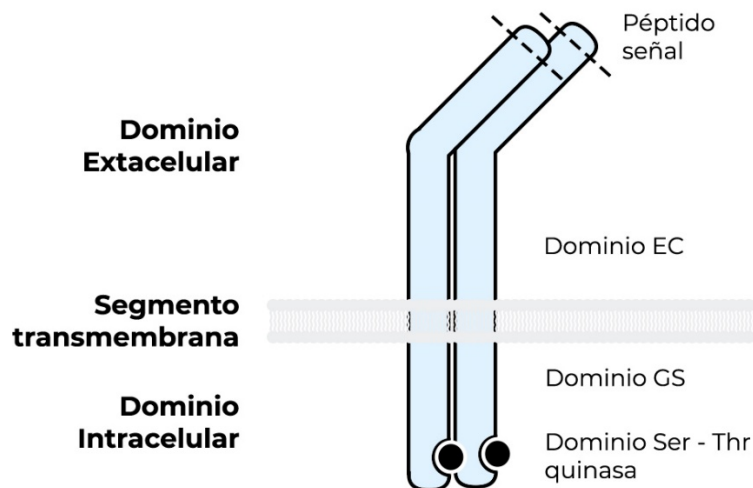


Figura 3. Estructura proteica de ALK1. Adaptado de (González-Núñez, Muñoz-Félix and López-Novoa, 2013).

Regulación y actividad de ALK1

En la mayoría de tipos celulares, TGF- β señaliza a través del receptor ALK5, sin embargo, ALK1 es el receptor mayoritario en células endoteliales (Goumans, Lebrin and Valdimarsdottir, 2003).

ALK1 es incapaz de unirse directamente a su ligando, sino que forma complejos heteroméricos de receptores de alta afinidad con T β RII (Receptor de tipo II) en presencia del ligando (Attisano *et al.*, 1993). Después de la unión del ligando y el reclutamiento de ALK1, T β RII fosforila el dominio GS yuxtamembrana de ALK1. Esta fosforilación del receptor de tipo I, hace que se cambie esta región pasando a ser un sitio de acoplamiento para sus sustratos, la familia de factores de transcripción Smad que propagan la señal hacia el interior del núcleo (Huse *et al.*, 2001; Massagué, 2006).

4.1.2. Los receptores de TGF- β de tipo II

Los receptores de tipo II son cinco, ActR-IIA, ActR-IIB, BMPRII, AMHRII y T β RII. Sin embargo, cabe destacar que el receptor específico para TGF- β es T β RII (por sus siglas en inglés, *TGF- β receptor type II*) y que el receptor BMPRII (por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic protein receptor type II*) es específico de BMP9 (Derynck and Feng, 1997; Upton *et al.*, 2009). Ambos receptores se encuentran siempre formando dímeros y se autofosforilan en varios residuos de serina y tirosina (Derynck and Feng, 1997). Tras unirse a su ligando, como ya se ha descrito, los receptores de tipo II reclutan al receptor de tipo I (ALK) y fosforilan su “dominio GS”. Esta fosforilación activa el dominio quinasa de los receptores de tipo I, mediador de la transducción de la señal del ligando al interior celular (Huang and Chen, 2012).

4.1.3. Los receptores de TGF- β de tipo III

Por último, existe un tercer tipo de receptores de TGF- β denominados receptores de tipo III, son endogлина y betaglicano. Estos receptores carecen de actividad enzimática, por lo que no son capaces de transducir ninguna señal al citoplasma, pero sí de modular la señal que el ligando transmita a través del complejo de receptores; por ello son considerados receptores auxiliares (Gougos and Letarte, 1990). Endogлина puede ser fosforilada en varios residuos tanto por T β RII como por ALK1 y ALK5, y de ello depende su función en la modulación de la señal de TGF- β (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2006).

La proteína endoglina

La endoglina es una glicoproteína de membrana que consta de 658 aminoácidos (Gougos and Letarte, 1988). El gen de endoglina (*ENG*) se expresa predominantemente en el endotelio y, en menor medida, en células del músculo liso vascular, pericitos, células de origen hematopoyético o fibroblastos (St-Jacques *et al.*, 1994; Graulich *et al.*, 1999). Está formada por dos subunidades de 90 kDa unidas entre sí por dos puentes disulfuro (Gougos and Letarte, 1990; Llorca *et al.*, 2007).

A. Estructura proteica extracelular de la endoglina

El dominio extracelular consta de dos regiones diferenciadas, por una parte, un dominio huérfano N-terminal, portador de la secuencia de unión de TGF- β y BMP9, en su papel de receptor auxiliar de estos receptores (López-Casillas *et al.*, 1994; Castonguay *et al.*, 2011; Alt *et al.*, 2012). Y, en segundo lugar, el dominio ZP (Zona Pelúcida) que participa en la oligomerización de endoglina y en su interacción con los receptores T β RII y ALK5 (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). Además, consta del tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato) implicado en adhesión celular (Gougos and Letarte, 1990; Cheifetz *et al.*, 1992; Llorca *et al.*, 2007), ver [Figura 4](#).

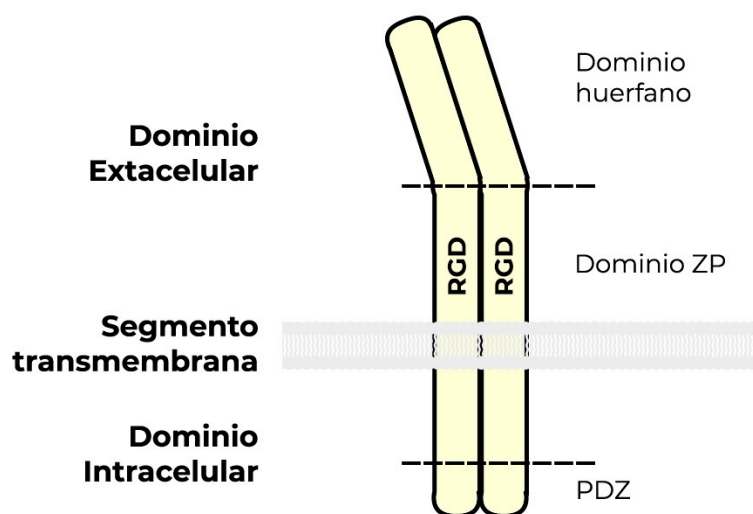


Figura 4. Estructura molecular del dímero de endoglina. Adaptado de (Koleva *et al.*, 2006).

El dominio RGD y su interacción con proteínas de adhesión

Este péptido se encuentra fundamentalmente en proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). En la endoglina de ratón, se ha descrito un motivo equivalente, TDD, también con capacidad para unirse a integrinas (Lum, Reid and Blobel, 1998; Rossi *et al.*, 2013). Poco se sabe acerca de las proteínas que pueden interaccionar con el dominio RGD de endoglina, pero recientemente se han publicado varios trabajos en los que se demuestra cómo endoglina favorece la trans migración leucocitaria a través de la barrera endotelial gracias a su unión a las integrinas de los leucocitos a través de este tripéptido RGD (Rossi *et al.*, 2013) y cómo esta unión favorece la adhesión de pericitos a células endoteliales gracias a la interacción de integrinas de pericitos con endoglina del endotelio (Rossi, Lopez-Novoa and Bernabeu, 2014). Por último, durante el desarrollo de la tesis, se publicó un trabajo llevado a cabo por Rossi *et al.* que describe la interacción plaquetaria con el endotelio, a través de la interacción endoglina-integrinas (Rossi *et al.*, 2018).

Papel fisiológico de las Integrinas con afinidad por el dominio RGD

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, constan de subunidades α y β , que participan en la unión a componentes de la matriz extracelular, así como en uniones célula-célula (Klapholz and Brown, 2017). Las dieciocho subunidades α de integrina y 8 subunidades β , dimerizan en distintas combinaciones para formar 24 integrinas diferentes y les confiere a cada heterodímero afinidad selectiva por distintos sustratos (Humphries, Byron and Humphries, 2006).

Las integrinas pueden dividirse en cuatro subgrupos según la naturaleza de sus ligandos. La subfamilia de integrinas más grande son las integrinas con afinidad por los receptores de arginina-glicina-aspartato (RGD) (Kapp *et al.*, 2013). A este subgrupo pertenecen la integrina α IIb β 3, o receptor GPIIb/IIIa, que se expresa en la superficie de plaquetas, megacariocitos y

leucocitos, en especial monocitos. No obstante, la presencia de esta integrina en leucocitos es de origen plaquetario ya que se debe a fragmentos de plaquetas, denominados micropartículas plaquetarias, que se unen a la superficie de los monocitos (Clemetson, 2017). La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ está implicada en la regulación de la agregación plaquetaria en el proceso de hemostasia primaria. La activación rápida de esta integrina en un daño vascular es necesaria para que ocurra la hemostasia (Shattil, Kashiwagi and Pampori, 1998). En los agregados plaquetarios, el fibrinógeno sirve como puente de unión entre dos plaquetas activas que se unen a través de dos integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ expuestas en la superficie plaquetaria, esta unión integrina-fibrinógeno se produce a través del motivo RGD del fibrinógeno (Hynes, 1992). La regulación precisa a través de la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es importante para controlar la agregación plaquetaria, ya que se ha descrito que la activación errónea de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ puede hacer que un trombo plaquetario ocluya un vaso sanguíneo provocando situaciones patológicas como infarto de miocardio o ictus (Wagner *et al.*, 1996; Ginsberg, 2014).

Por su parte, las integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ expresadas en osteoclastos y células endoteliales están implicadas en la angiogénesis (Weis and Cheresh, 2011). La integrina $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ se une a la fibronectina de la matriz extracelular, a través del motivo de reconocimiento de RGD (Aota, Nomizu and Yamada, 1994), también a fibrinógeno y colágeno desnaturalizado (Tuckwell *et al.*, 1994). Además, se ha descrito que se encuentra altamente expresado en las células endoteliales durante la angiogénesis y se expresa en la superficie de diversas de células tumorales (Kapp *et al.*, 2013). Se ha puesto de manifiesto la existencia de una interacción funcional entre endoglina y las subunidades de integrinas β1 (Gougos *et al.*, 1992; Conley *et al.*, 2004; Muenzner *et al.*, 2010). Estas evidencias sugieren la posibilidad de que la endoglina en las células endoteliales interactúe con integrinas de las células murales (Rossi *et al.*, 2016). Se ha demostrado mediante co-inmunoprecipitación que endoglina se une a la subunidad α5 pero de forma independiente al dominio

RGD (Tian *et al.*, 2012). Además, estos mismos autores muestran cómo la formación de complejos ligando / receptor entre fibronectina y la subunidad $\beta 1$ promueven la unión de endogлина a ALK1 y la señalización de TGF- $\beta 1$ a través la vía de Smad1/5/8. TGF- $\beta 1$, por su parte, activa la señalización a través de integrinas $\alpha 5\beta 1$ de forma endogлина-dependiente. En relación con la señalización de TGF- β , la inhibición de ALK5 de forma simultánea al estímulo con Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) o VEGF y FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos, por sus siglas en inglés *Fibroblast Growth Factor*) en células madre del cordón umbilical (HUVEC, por sus siglas en inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) induce la expresión de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y $\beta 3$, entre otros genes proangiogénicos (Liu *et al.*, 2009).

B. Estructura intracelular de endogлина y su papel como componente de la ruta de señalización de TGF- β

En cuanto al dominio intracelular de endogлина, posee una única región transmembrana y un corto dominio citoplasmático, que consta de 47 aminoácidos, entre ellos numerosos residuos serina y treonina susceptibles de ser fosforilados por T β RII, ALK1 o ALK5 (Lastres *et al.*, 1994; Koleva *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2014). Brevemente, T β RII fosforila endogлина en los residuos Ser634 y Ser635. El receptor de tipo I, ALK1, fosforila endogлина en Thr640 y Thr654. Para que este paso ocurra, ALK1 requiere que las serinas Ser634 y Ser635 de endogлина hayan sido previamente fosforiladas por T β RII. ALK5, por su parte, fosforila endogлина en su residuo Ser646 que es esencial en el caso de la activación por TGF- β , mientras que tanto la Ser646 como la Ser649 han de ser fosforiladas para la inducción por BMP9 (Ray *et al.*, 2010). La falta de fosforilación de estas dos serinas por ALK5 también inhibe la fosforilación de endogлина por ALK1, ver [Figura 5](#) (Lastres *et al.*, 1994; Koleva *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2010).

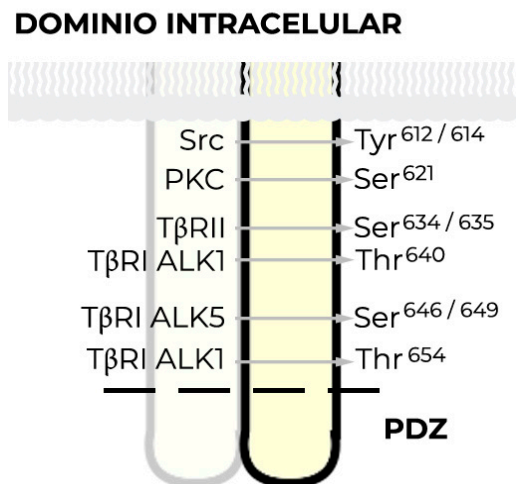


Figura 5. Dominio intracelular de endoglina. Adaptado de (Koleva *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2014).

En definitiva, endoglina es un sustrato de estos receptores y, a pesar de no tener actividad enzimática, modula la señal que se transmite al interior de la célula a través del complejo de receptores (Koleva *et al.*, 2006).

4.2. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE TGF- β EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

La activación del complejo de receptores de TGF- β por unión del ligando induce la cascada de señalización de las proteínas Smad (del inglés, *Small protein Mothers Against Decapentaplegic*) que, una vez activadas, forman un complejo que se transporta al núcleo, donde actúa como factor de transcripción. Las proteínas R-Smad (del inglés, *Receptor-regulated*) se clasifican en dos grupos, en función del receptor de tipo I que las activa; así, ALK1 activa a Smad 1, 5 y 8, mientras que ALK5 fosforila a Smad 2 y 3. La fosforilación de las proteínas R-Smad permite su oligomerización con Smad4 o Co-Smad (del inglés, *Common partner*), que colabora con las isoformas R-Smad en su función reguladora de la transcripción (Mahmoud *et al.*, 2009). Las proteínas Smad se someten continuamente a un desplazamiento núcleo-citoplasma al interactuar con complejos de poros nucleares. Una vez en el

núcleo, las proteínas Smad activadas forman complejos finales que regulan la transcripción del gen diana, generando aproximadamente trescientas respuestas genéticas (Massagué, 2006).

En el endotelio, la teoría más aceptada acerca de la señalización de TGF- β 1 defiende que esta citoquina puede ejercer efectos diversos en función de sus niveles y del contexto celular. Así, bajos niveles de TGF- β 1 activan a los receptores ALK1 / ALK5 / T β RII, que señalizan a través de la vía de Smad 1/5/8 que tiene como gen reportero Id1 (por sus siglas en inglés, *Inhibitor of DNA binding 1*) que promueve la proliferación y la migración endotelial, e inhibe la producción de MEC. Esto, genera un efecto proangiogénico, promoviendo la degradación de la matriz, así como la proliferación y migración de las células endoteliales. En cambio, niveles elevados de TGF- β 1 activan la señalización a través de ALK5 / T β RII y la vía de Smad2/3, que induce la expresión de PAI-1 (por sus siglas en inglés, *Plasminogen Activator Inhibitor 1*), promoviendo la transcripción de genes con funciones antiangiogénicas como la producción de membrana basal y la maduración y estabilización del nuevo vaso, ver [Figura 6](#) (Goumans *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2002; Holderfield and Hughes, 2008; Pardali, Goumans and ten Dijke, 2010).

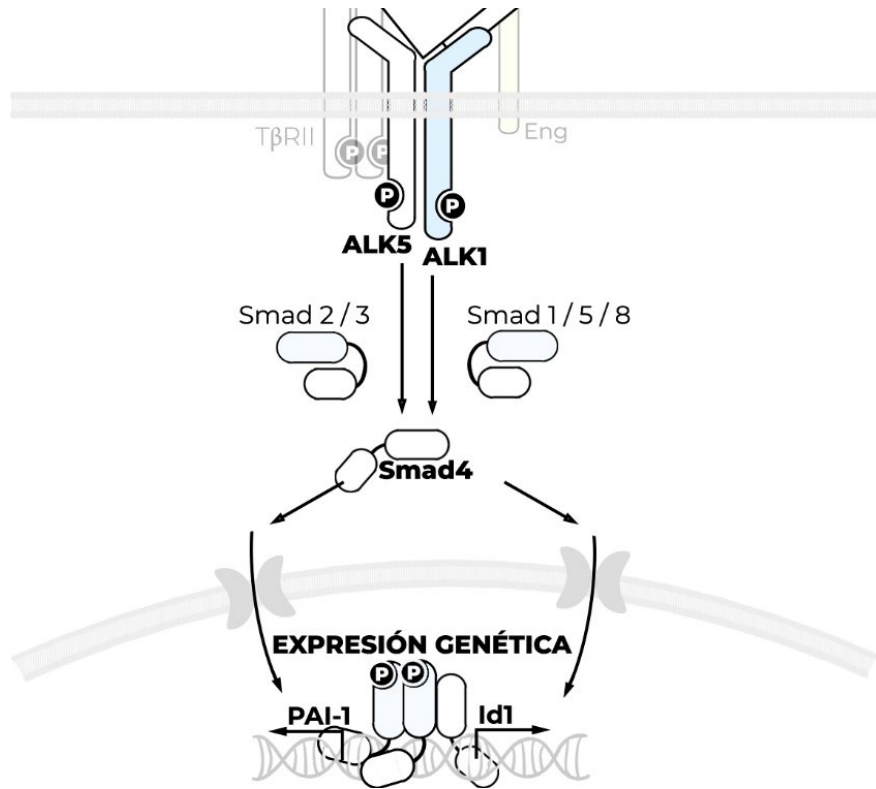


Figura 6. Señalización intracelular de ALK5 y ALK1. Adaptado de (Kritharis, Al-Samkari and Kuter, 2018).

5. BASES MOLECULARES DE LA SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Como ya se ha descrito, hasta la fecha, todos los genes implicados en la etiología de la enfermedad de HHT, codifican proteínas que pertenecen o participan en la ruta de señalización de TGF- β en células endoteliales. A saber, endogлина, ALK1, Smad4 y BMP9 (Govani and Shovlin, 2009). Dentro de las funciones que tiene TGF- β en el endotelio, podemos destacar que TGF- β regula el estado de activación o de quiescencia de las células endoteliales, en decir, actúa tanto de modo inhibitorio como estimulador de la angiogénesis en función de los niveles de TGF- β (Pardali, Goumans and ten Dijke, 2010). La angiogénesis es un proceso complejo, finalmente regulado, que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Pepper, 1997). La angiogénesis tiene lugar durante el desarrollo embrionario y el desarrollo postnatal, pero puede ser reactivada durante la

edad adulta en procesos como la revascularización post-isquemia, reparación de heridas o en el desarrollo placentario, y también en situaciones patológicas, como infarto de miocardio o el crecimiento tumoral (Munoz-Chapuli, 2011).

Como se ha comentado, tanto TGF- β como las BMP son miembros de la misma superfamilia y participan activamente en la angiogénesis. En las células endoteliales, BMP9 señala a través de la vía de ALK1 y las Smads 1/5/8 (David *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2012). La señalización por la vía de ALK1 genera una situación proangiogénica, debido a que se promueve degradación de la matriz extracelular, además de la proliferación y migración de las células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Bertolino *et al.*, 2005; Lebrin *et al.*, 2005). Por su parte, la fosforilación de endogлина regula la señalización de TGF- β 1 y BMP9 a través de las vías de las proteínas Smad 1/5/8. La expresión de endogлина se ve incrementada en células endoteliales en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Burrows *et al.*, 1995; Anderberg *et al.*, 2013), así como en respuesta al principal estímulo angiogénico, que es la hipoxia (Park *et al.*, 2013; Barnett *et al.*, 2014). Por último, Smad4 tiene una función reguladora, colabora con las isoformas, en este caso el complejo Smad 1/5/8 para la transmisión de la señal hasta el núcleo (Mahmoud *et al.*, 2009).

Mutaciones en estos genes conducen a la haploinsuficiencia de alguno de los componentes de la ruta de señalización de TGF- β lo que implica una deficiencia en la señalización de esta superfamilia (Zarrabeitia *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe destacar, que a pesar de que todos los pacientes de HHT tienen mutaciones en alguno de los genes postulados, llama la atención la penetrancia variable de las manifestaciones clínicas. El hecho de que aumente con la edad, genera la teoría de que sea la pérdida de la expresión de ambas copias del gen la que impulse a la formación de AVM, debido a una mutación somática, denominada “*second hit*” (Arthur *et al.*, 2015). Esta teoría implicaría un fenómeno físico mecánico o inflamatorio que induciría la

deleción de la expresión de la segunda copia del gen. Esta idea se apoya en que las zonas de aparición de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad típicamente se localizan en mucosas, labios o pulpejos de los dedos, que coincide con zonas de mayor exposición ambiental, como exposición a rayos UV, resistencia al aire, a la temperatura o a lesiones físicas, que desencadenan mutaciones o respuestas proinflamatorias (Fernandez-Lopez *et al.*, 2007). A partir de esta teoría se desarrolló la teoría del tercer evento o “*third hit*” que dicta que es necesario un estímulo proangiogénico o inflamatorio para desarrollar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015). Esta se basa en observaciones realizadas en estudios con modelos de ratón iKO, donde se observó que las manifestaciones clínicas estaban limitadas a sitios donde existía un entorno proangiogénico o inflamatorio (Park *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2014; Garrido-Martin *et al.*, 2014).

5.1. DESARROLLO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS

Se ha descrito que la función deficiente de alguno de los receptores de la superfamilia de TGF- β lleva al desarrollo de importantes alteraciones vasculares (Oshima, Oshima and Taketo, 1996; Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015). Los ratones *knock-out* para cualquiera de las tres isoformas de TGF- β mueren durante el desarrollo embrionario por defectos en el desarrollo de la vasculatura (Pardali, Goumans and ten Dijke, 2010). Además, como se ha descrito, TGF- β 1 induce la angiogénesis en varios modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ma *et al.*, 2006; Evrard *et al.*, 2012; Peshavariya *et al.*, 2014). La inhibición de la señalización de TGF- β reduce la perfusión en la retina y altera la función de la barrera endotelial (Walshe *et al.*, 2009). Debido a la ausencia de un modelo de ratón

knock-out viable, se han utilizado tradicionalmente los ratones heterocigotos.

Los ratones heterocigotos para Alk1 o endogлина son haploinsuficientes, ya que expresan niveles proteicos de estos receptores de aproximadamente el 50% (Jerkic *et al.*, 2006; Gonzalez-Nunez *et al.*, 2015). Estos ratones pueden desarrollar malformaciones arteriovenosas y otros defectos vasculares que recuerdan a aquellos presentes en la HHT, sin embargo, la penetrancia de este fenotipo es incompleta y su frecuencia es baja, siendo mayor en los animales con fondo genético 129/Ola (Bourdeau, Dumont and Letarte, 1999; Srinivasan *et al.*, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la eliminación postnatal, mediante el desarrollo de ratones *knock-out* condicionales, de uno o los dos alelos de los genes de Alk1, endogлина o T β RII, conlleva el desarrollo de alteraciones en la vasculatura y/o deficiencias en la angiogénesis (Mahmoud *et al.*, 2010; Anderberg *et al.*, 2013; Tual-Chalot *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en el caso de la HHT se postula que la señalización aberrante de la cascada TGF- β durante el desarrollo vascular en la embriogénesis y la angiogénesis, genera ensanchamiento venular y retraso el remodelado vascular capilar que lleva a la aparición las malformaciones vasculares en forma de telangiectasias y malformaciones arteriovenosas (Gossage and Kanj, 1998; Mahmoud *et al.*, 2010).

5.2. ORIGEN DE LOS SANGRADOS

Como se ha descrito, las epistaxis es la forma más frecuente de presentación de los sangrados (Peery, 1987; Govani and Shovlin, 2009), sin embargo también se observan hemorragias gastrointestinales, hemoptisis, hematuria (Sureda *et al.*, 1991).

En parte por esta falta de estudios concluyentes, tradicionalmente se ha asumido que los sangrados recurrentes de deben a la fragilidad de los vasos

aberrantes, puesto que el desarrollo de estructuras vasculares anormales implica paredes frágiles y un flujo sanguíneo turbulento. Este hecho hace que estos vasos sean más propensos a romperse y por consiguiente, se genere una hemorragia (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003; Govani and Shovlin, 2009). No obstante, como desarrollaremos en el apartado de hipótesis, en nuestra opinión este hecho explicaría su frecuencia, pero no la gravedad de los mismos.

Para poder comprender las hipótesis planteadas acerca de la etiopatogenia de los sangrados en la HHT es necesario conocer el mecanismo intrínseco de la hemostasia, que se desarrollará a lo largo del siguiente apartado.

6. FISIOLÓGÍA DE LA HEMOSTASIA

Etimológicamente, el término hemostasia procede del griego, donde el lexema *hematos-*, que significa sangre y *-stasis*, que engloba un concepto de estabilidad, detención y equilibrio. Así, se entiende por hemostasia a todo el proceso de detención del sangrado, que está compuesto por un conjunto de eventos finamente regulados.

La hemostasia es un complejo sistema que coordina la participación de los vasos sanguíneos, las plaquetas y el sistema de coagulación en el plasma, que incluye los factores fibrinolíticos y sus inhibidores. Para simplificar los conceptos, este complejo sistema se divide en 3 fases, la contracción de la pared vascular, la hemostasia primaria, que engloba todas las funciones plaquetarias, adhesión, activación y agregación plaquetaria, para la formación de tampones plaquetarios, y por último, la hemostasia secundaria que implica la coagulación plasmática. Además, asociada a este sistema está el proceso de fibrinólisis. Todo ello, genera un sistema finamente regulado que culmina con el restablecimiento del flujo sanguíneo y estructuras vasculares.

A. FASES DE LA HEMOSTASIA

6.1. ESPASMO VASCULAR

Cuando se produce un daño en la pared de un vaso sanguíneo, se crea una respuesta en forma de espasmo vascular local. Esta se genera de manera muy rápida e intensa, y dura unos pocos minutos. La vasoconstricción se desencadena por reflejos del sistema nervioso, iniciados por los receptores locales del dolor, y la liberación de citoquinas con acción vasoconstrictora como la endotelina-1, procedente de las células endoteliales activas, o el tromboxano A₂, serotonina y epinefrina, secretados por las plaquetas activadas (Hiller, 2007; Paredes and Chan, 2013). Todas estas moléculas generan la contracción drástica del músculo liso vascular, por lo que el efecto vasoconstrictor solo se consigue en arterias y arteriolas (Palta, Saroa and Palta, 2014). Estos cambios en el calibre arteriolar contribuyen a la hemostasia, pues se evita temporalmente la extravasación de la sangre ya que reduce el flujo hacia el área lesionada, a su vez también ayuda a la formación del tapón hemostático (Hiller, 2007; Yau, Teoh and Verma, 2015).

6.2. HEMOSTASIA PRIMARIA

Es el conjunto de procesos que tienen lugar desde que se produce el daño y se activan las plaquetas, hasta la formación del tapón plaquetario inicial. En todo este proceso las plaquetas desempeñan un papel fundamental, junto con la pared del vaso y las proteínas de adhesión.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos rodeados por parte de la membrana plasmática de los megacariocitos de los que proceden (Rauch and Paris, 2018). Estas carecen de ADN genómico, pero contienen ARN mensajero derivado de los megacariocitos y las estructuras de traducción necesarias para la síntesis de proteínas (Davì and Patrono, 2007). En el lugar

de la lesión vascular, el subendotelio queda expuesto y las plaquetas reaccionan ante las moléculas de esta matriz subyacente. Forman un núcleo de trombos mediante un proceso de adhesión, activación, secreción del contenido de orgánulos de almacenamiento intracelular y agregación que se detalla a continuación (Sira, 2016).

6.2.1. Adhesión plaquetaria

La formación del trombo se inicia por la interacción de las plaquetas con un vaso sanguíneo dañado. La capa subendotelial, que queda expuesta, es altamente trombogénica por contener colágeno, factor de Von Willebrand (vWF, por sus siglas en inglés, *von Willebrand Factor*) y otras proteínas de como la laminina, la trombospondina y la vitronectina, que están involucradas en la adhesión de las plaquetas (Lasne, Jude and Susen, 2006; Palta, Saroa and Palta, 2014). Ante la exposición de estas proteínas subendoteliales, las plaquetas, cuya superficie tiene alta variedad de glicoproteínas con gran afinidad por ellas, interaccionan con esta superficie.

El vWF, que procede de las células endoteliales y las plaquetas, se libera y se une al colágeno de la matriz subendotelial y forma una superficie por la que el complejo GPIb-V-IX de las plaquetas tiene alta afinidad (Huizinga *et al.*, 2002). A su vez, el colágeno fibrilar tiene gran afinidad por otros complejos receptores de glicoproteína (GP), como la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$ (Farndale *et al.*, 2007). La vitronectina, muy abundante en plasma y la matriz extracelular, puede interaccionar con las integrinas $\alpha IIb\beta 3$ y $\alpha v\beta 3$ plaquetarias (Thiagarajan and Kelly, 1988; Versteeg *et al.*, 2013). Y la trombospondina-1 se libera de los gránulos α plaquetarios y se une a GPVI (CD36), lo que resulta en la activación de las plaquetas (Jurk *et al.*, 2003; Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Por último, la laminina es una glicoproteína de la matriz extracelular y la membrana basal, sintetizada por las células endoteliales. La unión de laminina a las plaquetas se realiza a través de la integrina $\alpha 6\beta 1$, ver [Figura 7](#) (Inoue, Suzuki-Inoue and Ozaki, 2008).

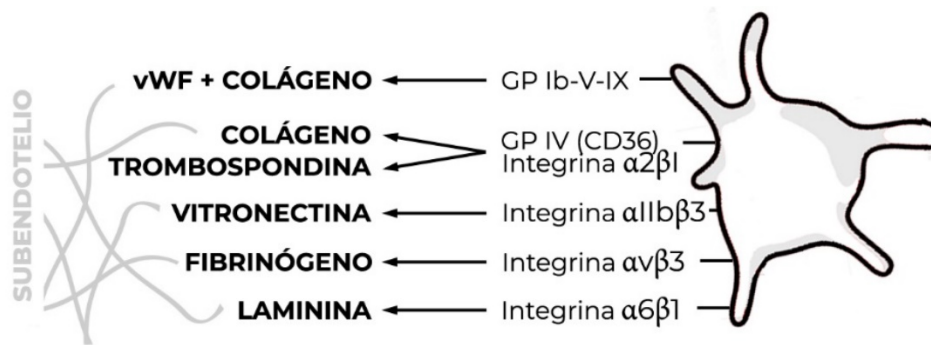


Figura 7. Interacciones que facilitan la adhesión plaquetaria.

La alta afinidad de estas glicoproteínas de anclaje, GP e integrinas, presentes en la superficie de las plaquetas hacia las proteínas de la matriz subendotelial, generan una unión firme de las plaquetas a la superficie dañada. Sin embargo, estas uniones no solo tienen un papel en la adhesión plaquetaria, sino que el establecimiento de enlaces con estas glicoproteínas genera respuestas de activación en las plaquetas (Sira, 2016).

6.2.2. Activación plaquetaria

A medida que las plaquetas se adhieren a los componentes subendoteliales del daño vascular se produce su activación (Sira, 2016). Esta adhesión se efectúa principalmente por medio del complejo glicoproteico GPIb-IX-V que se estabiliza después gracias a los receptores del colágeno, GPVI (Rauch and Paris, 2018). La acción de los receptores plaquetarios GPIb-IX-V y GPVI desencadena la activación plaquetaria a través de cascadas de señalizaciones intracelulares que convergen hacia la activación de proteínas quinasas, como Src, Syk, y proteína kinasa C (Canobbio, Balduini and Torti, 2004). Paralelamente, la adhesión de las plaquetas a la trombospondina a través de CD36 (GPVI, GPIIb) causa importantes eventos de señalización donde también están implicadas varias proteínas quinasas (Petrovan and Ruf, 2001). Ambas vías conducen a la movilización del calcio que está implicado en la activación de las integrinas, principalmente la αIIbβ3 que es el principal receptor de la agregación plaquetaria, proceso descrito en apartados posteriores (Jackson, Nesbitt and Kulkarni, 2003; Davì and Patrono, 2007).

La activación plaquetaria se acompaña de la modificación de su morfología, indispensable para la generación de las reacciones de secreción y de agregación. Cabe destacar que $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ también es capaz de interactuar con el citoesqueleto plaquetario, controlando los cambios en la forma, señalización y contracción del trombo formado, mediando así la propagación plaquetaria y la retracción del coágulo (Sira, 2016). En cuanto a su morfología, la plaqueta pasa de forma discoide a esférica, con emisión de pseudópodos y centralización de los orgánulos intracelulares.

Brevemente, las plaquetas discoides interactúan a través de los receptores de adhesión, fundamentalmente GPIb-V-IX con los componentes de la matriz extracelular como VWF y el colágeno, las plaquetas adheridas se activan, y se produce la reestructuración del citoesqueleto de actina por conexiones estrechas entre GPIb-V-IX y el citoesqueleto de membrana (Jackson, Mistry and Yuan, 2000; Nurden and Nurden, 2011). Así, las plaquetas cambian a una forma esférica donde forman pseudópodos, expresan integrinas activadas y secretan agentes autocrinos. Estos cambios, dan como resultado la unión plaqueta-plaqueta generando la agregación de múltiples plaquetas circulantes, lo que implica el crecimiento del tapón hemostático.

6.2.3. Secreción plaquetaria

Tras la adhesión inicial de las plaquetas a la matriz extracelular, el tiempo de respuesta de la hemostasia primaria es muy corto. Esto se debe a la acción de los mediadores autocrinos y paracrinos que amplifican y mantienen la respuesta inicial (Davì and Patrono, 2007). Después de la adhesión, se induce la fusión de la membrana de los gránulos que permite la liberación de su contenido al exterior. Existen dos tipos de gránulos de almacenamiento de plaquetas, los gránulos α y cuerpos densos.

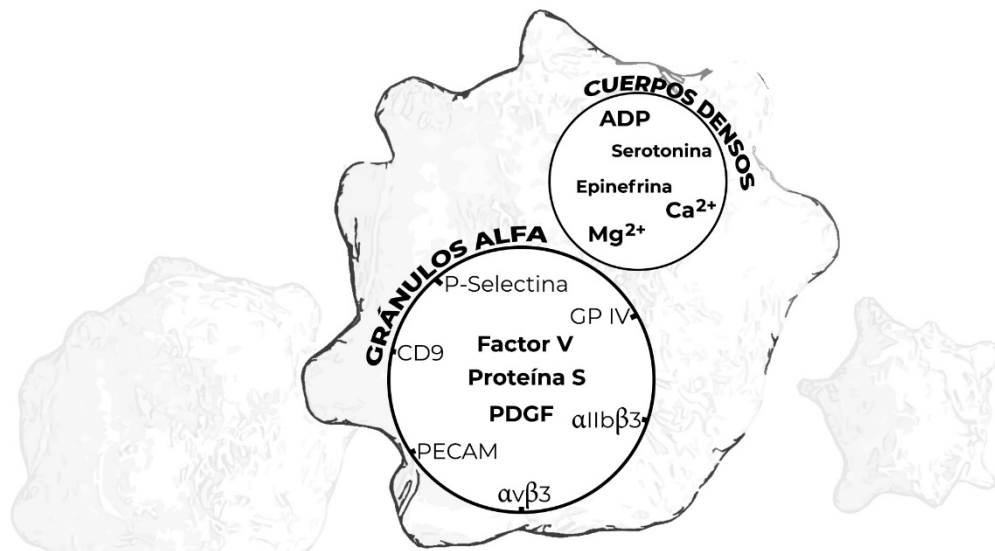


Figura 8. Contenido de los gránulos alfa y cuerpos densos de las plaquetas.

Los gránulos α contienen proteínas específicas de las plaquetas, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés *Platelet Derived Growth Factor*), quimiocinas, moléculas adhesivas y proteínas de coagulación, como el factor V y la proteína S. No obstante, no solo el contenido secretado amplifica el potencial procoagulante de las plaquetas. Existen glucoproteínas en la cara interna de los gránulos α , que se exponen tras la fusión de estos con la membrana plaquetaria, como la P-selectina (CD62), integrina $\alpha IIb\beta 3$, GPIV (CD36), CD9, PECAM (por sus siglas en inglés, *Platelet Endothelial Cell Adhesión Molecule*) o el receptor de vitronectina, ver [Figura 8](#) (Rendu and Brohard-Bohn, 2001). Por su parte, los cuerpos densos contienen adeninas no metabólicas, como adenosín difosfato (ADP), cationes divalentes, Ca^{2+} y Mg^{2+} y moléculas como serotonina o la epinefrina, moléculas imprescindibles para la retroalimentación de la activación plaquetaria y la respuesta vasoconstrictora local (Sira, 2016). La liberación de calcio es de particular importancia en la activación de fosfolípidos de la superficie de las plaquetas que luego proporcionan una superficie para el ensamblaje de diversos factores de coagulación. La mayoría de los agonistas que activan las plaquetas operan a través de los receptores acoplados a la proteína G, [Figura 8](#). La vía final para todos los agonistas es la activación de la glicoproteína de

la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, el principal receptor de adhesión y agregación (Davì and Patrono, 2007).

6.2.4. Agregación plaquetaria

Tras la activación de las plaquetas, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Bledzka, Smyth and Plow, 2013), la glicoproteína más abundante en las plaquetas, se activa y experimenta un cambio conformacional que hace que tenga más afinidad por varios ligandos extracelulares como el fibrinógeno, el vWF, la fibronectina, la vitronectina y CD40 (implicado en la respuesta inmune) (Sira, 2016). Estas uniones permiten la formación de puentes interplaquetarios con múltiples plaquetas que fluyen y se agregan a través de puentes con estas proteínas.

La unión del fibrinógeno y el vWF a la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ produce coágulos de fibrina a través de la acción de la trombina. Brevemente, las plaquetas activadas externalizan, en la lámina externa de su membrana plasmática, fosfatidilserina, que constituye una superficie procoagulante para la captación de los complejos enzimáticos de la tenasa y la protrombinasa (Munnix *et al.*, 2007), que lleva a la generación masiva de trombina y la consecuente formación de fibrina y un coagulo de fibrina, este proceso se detalla en el apartado de “hemostasia secundaria y sistema de coagulación” (Zwaal and Schroit, 1997; Versteeg *et al.*, 2013; Rauch and Paris, 2018).

Por último, la molécula adhesiva fibronectina, una glicoproteína dimérica, está presente en abundancia en plasma sanguíneo, megacariocitos y gránulos α de plaquetas. De manera similar al fibrinógeno, la fibronectina media la agregación plaquetaria a través de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, pero también se une a las integrinas $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ y $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Ni *et al.*, 2003; Maurer, Tomasini-Johansson and Mosher, 2010).

6.3. HEMOSTASIA SECUNDARIA Y SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

La hemostasia primaria es, sin embargo, solo temporalmente efectiva. La hemorragia puede comenzar de nuevo a menos que la hemostasia secundaria refuerce el tapón plaquetario formando un coágulo de fibrina estable (Hiller, 2007). El sistema de coagulación plasmática consiste en una serie de reacciones que involucran la activación de zimógenos, precursores de enzimas inertes, actuando como cofactores para la activación de factores enzimáticos procoagulantes, teniendo como resultado final la polimerización de la fibrina y la activación de las plaquetas, lo que converge en la formación de un coágulo de fibrina (Smith, Travers and Morrissey, 2015).

Según el modelo actual (Monroe and Hoffman, 2006), la coagulación se puede dividir en tres fases, la fase de iniciación, en la que se generan bajas cantidades de factores coagulantes activos; la fase de amplificación, en la que se aumenta el nivel de los factores de coagulación activos y la fase de propagación, en la que se forman factores de coagulación que se unen a membranas altamente procoagulantes de plaquetas activadas y se forman coágulos de fibrina (Mackman, 2009).

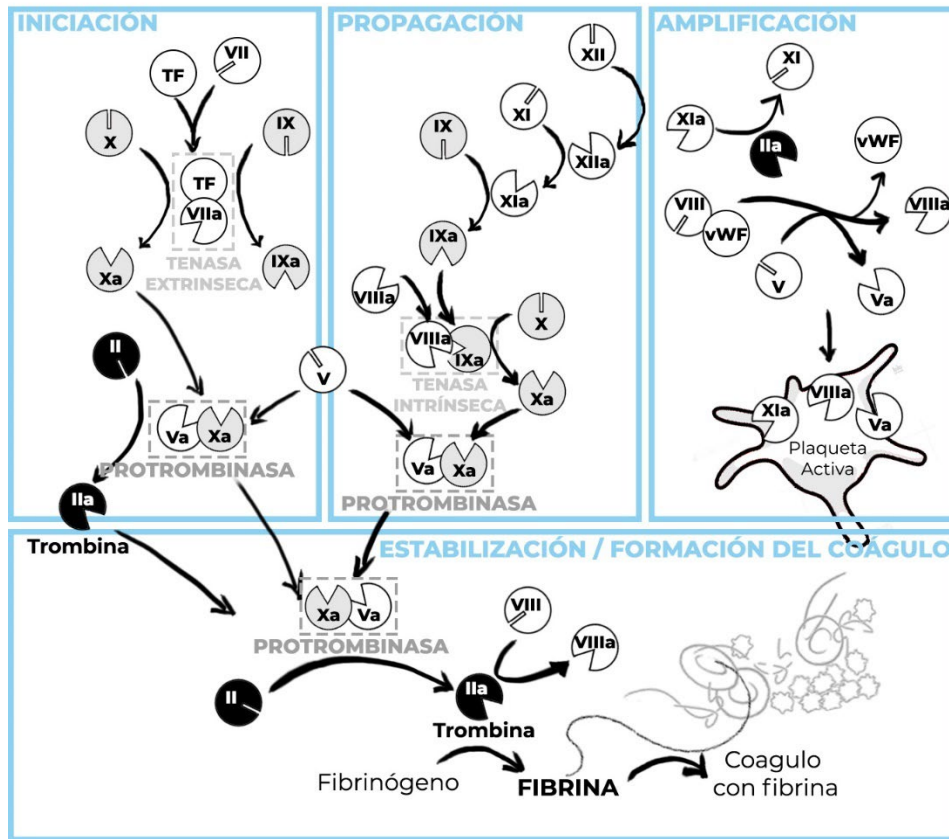


Figura 9. Cascada de la coagulación. Interacción de los factores de la coagulación en las fases de iniciación propagación, amplificación y estabilización de la coagulación. Adaptado de (Spronk *et al.*, 2014)

6.3.1. Iniciación de la coagulación

Paralelos a los eventos que se producen en la hemostasia primaria, cuando las células endoteliales se activan expresan, junto con las células de músculo liso, una molécula altamente procoagulante, el factor tisular (TF, de sus siglas en inglés *Tissue Factor*, que inicia la cascada de coagulación. El factor tisular, también denominado tromboplastina tisular, factor de coagulación III o CD142, es una proteína de membrana abundante en las células adventicias que rodean a todos los vasos sanguíneos y en una variedad de capas epiteliales, como cápsulas de órganos (Drake, Morrissey and Edgington, 1989; Wilcox *et al.*, 1989; Fleck *et al.*, 1990). Cabe destacar que las células sanguíneas circulantes, así como las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, generalmente no expresan TF. La presencia

de mediadores en situaciones inflamatorias (Geczy, 1994; Camerer, Kolstø and Prydz, 1996) o hipóxicas (Yan *et al.*, 1999) pueden estimular la expresión de cantidades significativas de TF en estas células.

Cuando la sangre se expone a células que expresan TF en su superficie, como ocurre en el tejido subendotelial o células endoteliales activas, se inicia la coagulación (Sira, 2016). TF se une al factor de coagulación circulante FVII, donde TF actúa como un cofactor para generar la proteólisis y activación de FVII, que se convierte en FVII activo (FVIIa). El FVIIa libre es una enzima muy débil, pero cuando TF se une con FVIIa para formar el complejo TF/FVIIa se convierte en un activador de la coagulación muy potente y activa por proteólisis dos sustratos posteriores en la cascada de coagulación, el factor IX (FIX) y FX que pasan a su forma activa FIXa y FXa, respectivamente. A continuación, estas dos enzimas activas se ensamblan en las superficies de membrana junto con sus propios cofactores, FVIIIa en el caso de FIXa o FVa en el caso de FXa, propagando así la cascada de coagulación. Los fosfolípidos cargados negativamente, en particular la fosfatidilserina, son necesarios para la unión de los sustratos, FIX o FX, a la superficie de los fosfolípidos. Las células intactas e inactivas que expresan TF en sus superficies tienen una actividad procoagulante mucho menor que las células dañadas o activadas (Maynard *et al.*, 1977; Smith, Travers and Morrissey, 2015). El factor Xa se une a la protrombina para generar una pequeña cantidad de trombina que, por sí sola, es insuficiente para generar fibrina, ver [Figura 9 Iniciación](#) (Sira, 2016).

6.3.2. Amplificación de la concentración de trombina

Dado que la cantidad de trombina generada hasta este momento es insuficiente para convertir el fibrinógeno en fibrina, existen numerosos ciclos de retroalimentación positiva. Esta retroalimentación positiva desencadenada por la trombina se produce principalmente en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas circulantes que se han adherido al sitio de la

lesión se activan por acción de la trombina y forman un agregado de plaquetas, este proceso se ha descrito en el apartado de “agregación plaquetaria” de la hemostasia primaria. En definitiva, a lo largo de este proceso, las plaquetas se cubren con factores de coagulación activados, una situación de preparación para la fase de propagación, ver [Figura 9 Amplificación](#) (Sira, 2016).

6.3.3. Propagación y estabilización del coágulo

En la fase final de propagación, la generación de trombina se amplifica en las superficies de las plaquetas activadas por la acción de dos complejos, el factor VIIIa unido al factor IXa (tenasa intrínseca) y el factor FVa unido al factor FXa (protrombinasa). Ambos complejos aceleran la activación del factor FII por FXa y FIXa, generando niveles suficientes de trombina para producir grandes cantidades de fibrina insoluble. En esta fase, la trombina también escinde FXIII en FXIIIa, que reticula covalentemente las cadenas de fibrina para formar una gran malla de fibrina. En conjunto, el agregado de plaquetas y la fibrina reticulada forman un coágulo estable, que sella la lesión y evita la pérdida excesiva de sangre [Figura 9 Propagación](#).

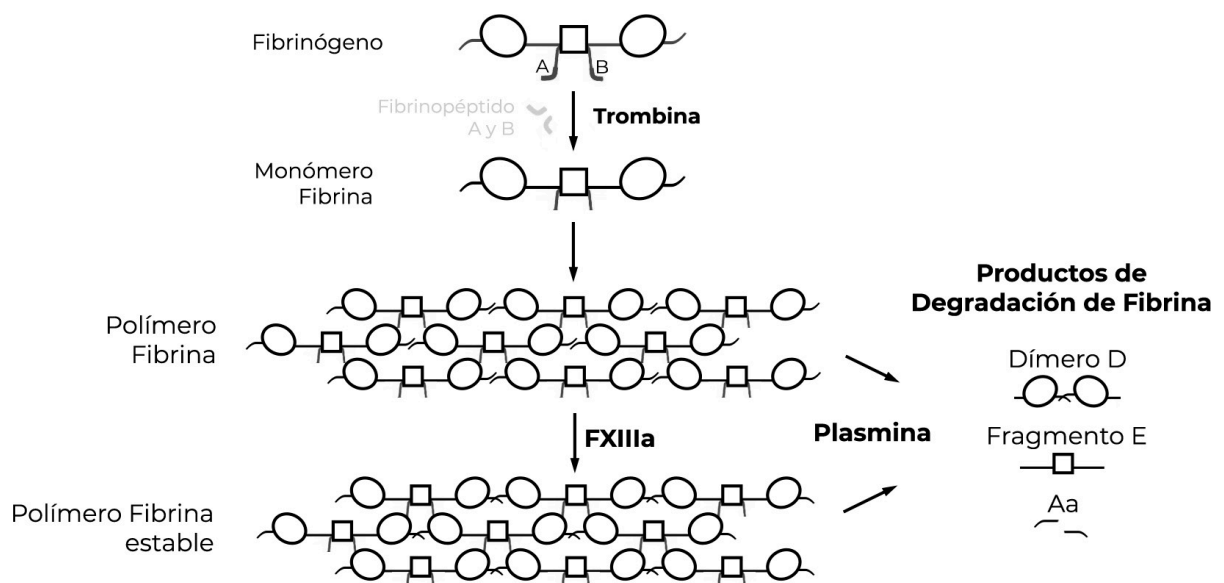


Figura 10. Formación de los polímeros de fibrina. La trombina escinde los fibrinopéptidos A y B que transforma la molécula en monómeros de fibrina. Estos monómeros interactúan entre sí formando polímeros que en presencia

de FXIIIa se vuelven más estables. En presencia de plasmina estas fibras de fibrina se degradan y dan lugar a productos de degradación de fibrina. Adaptado de (Riley *et al.*, 2016).

Brevemente, el fibrinógeno, que circula en la sangre, consta de dos conjuntos de tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. El principal objetivo molecular de la trombina es el fibrinógeno, que lo convierte en monómeros de fibrina. Estos monómeros interactúan entre sí, formando unas fibras de fibrina que se ensamblan gradualmente entre sí, ver [Figura 10](#). Por su parte, el factor FXIIIa, factor de estabilización de la fibrina, enlaza covalentemente los polímeros de fibrina y forma agregados fibrilares que, junto con las plaquetas y los glóbulos rojos, proporcionan integridad estructural al trombo en crecimiento (Wolberg, 2007). La estabilidad del coágulo la proporciona factores como la geometría de la red de fibrina, la concentración local de trombina, la concentración local de calcio, el pH y el número de plaquetas (Aleman *et al.*, 2014; Chapin and Hajjar, 2015).

6.4. FIBRINOLISIS

El sistema fibrinolítico es un sistema paralelo que se activa junto con la cascada de coagulación y sirve para focalizar y regular la formación de coágulos. Es un proceso enzimático cuyo principal efector es la plasmina que disuelve el coágulo de fibrina, por escisión de las fibras de fibrina. El resto de componentes de la fibrinólisis son moléculas que regulan de manera directa o indirecta la actividad de la serina proteasa plasmina, ver [Figura 11](#) (Vaughan *et al.*, 2017).

CASCADA DE LA FIBRINOLISIS

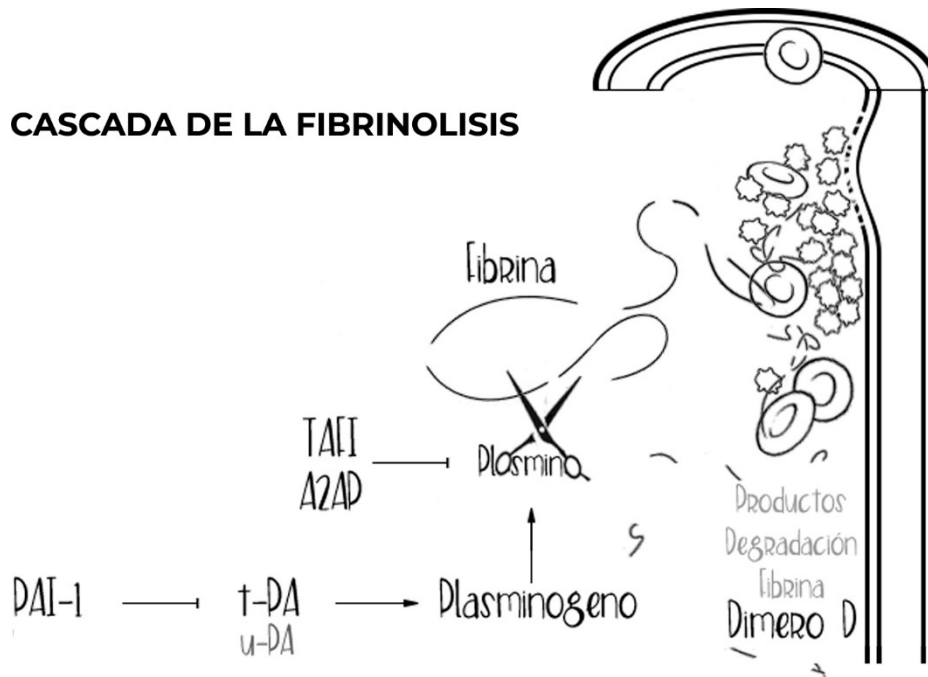


Figura 11. Cascada de la fibrinólisis. El plasminógeno se transforma en plasmina por activación de t-PA o u-PA. Este sistema es inhibido por PAI-1 que actúa sobre t-PA o bien por TAFI y A2AP que inhiben la plasmina.

El precursor inactivo de plasmina, el plasminógeno, se encuentra en plasma y es sintetizado principalmente por el hígado (Castellino and Ploplis, 2005). Este puede ser activado por dos enzimas, el activador tisular del plasminógeno (t-PA, por sus siglas en inglés, *tissue-type Plasminogen Activator*) o la uroquinasa (u-PA, por sus siglas en inglés *urokinase-type Plasminogen Activator*) ambos pertenecientes a la familia de la serina-proteasa. Mientras que el t-PA es sintetizado y liberado por las células endoteliales y actúa principalmente sobre las matrices de fibrina polimerizadas resolviendo los depósitos de fibrina en la vasculatura, el u-PA es producido por monocitos, macrófagos y epitelio urinario, focaliza la activación del plasminógeno sobre las superficies celulares, como los macrófagos activados y los neutrófilos, teniendo un papel en la remodelación de la matriz extracelular (Chana-Muñoz *et al.*, 2019). Ambos activadores tienen vidas medias muy cortas debido a la presencia de altas concentraciones de inhibidores específicos, o serpinas (Este término procede del inglés, *serpin*, *serin protease inhibitor*). En condiciones fisiológicas, las dos serpinas más importantes en la fibrinólisis son el inhibidor-1 del

activador del plasminógeno (PAI-1) y la antiplasmina $\alpha 2$ (A2AP, por sus siglas en inglés *Alpha 2-antiplasmin*) (Chapin and Hajjar, 2015). La A2AP se une a la plasmina con estequiometría 1: 1, con lo que ambos se vuelven inactivos. Sin embargo, cuando la plasmina se une a la fibrina, está protegida de la inhibición de la A2AP, lo que permite que la fibrinólisis proceda. De manera similar, los activadores del plasminógeno t-PA y u-PA son rápidamente inhibidos por el PAI-1, que se libera a la circulación por las células endoteliales, las plaquetas y otras células (Schneider and Nesheim, 2004). El sistema fibrinolítico también está regulado por el inhibidor de la fibrinólisis activada por la trombina (TAFI, por sus siglas en inglés *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*) es un inhibidor de la fibrinólisis no dependiente de serpina que se activa por la trombina asociada a la trombomodulina. TAFI es una peptidasa que elimina los residuos de lisina y arginina C-terminal en la fibrina, disminuyendo así el número de sitios de unión al plasminógeno disponibles y en consecuencia la generación de plasmina. TAFI se encuentra en niveles reducidos en pacientes con hemofilia, como resultado de la rotura de trombina alterada, y conduce a un aumento de la fibrinólisis (Mosnier *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2017). Todos estos inhibidores son importantes para regular la fibrinólisis y prevenir el exceso de plasmina no regulada o la actividad del activador del plasminógeno (Chapin and Hajjar, 2015).

Los productos de degradación de la fibrina (FDP, por sus siglas en inglés *Fibrin Degradation Products*) comienzan a formarse a medida que el plasminógeno se activa y la plasmina comienza a degradar el trombo. Se liberan múltiples FDP, incluidos el fibrinopéptido B y otros monómeros y dímeros de degradación de la fibrina (Latallo *et al.*, 1962). Cuando los polímeros de fibrina son escindidos por la plasmina en el sitio del fragmento D, el fragmento del dímero D resultante refleja el grado de trombosis y la actividad de la plasmina. Los estudios del dímero D han encontrado en él un valor predictivo y pronóstico en varios estados patológicos, incluida la

coagulación intravascular diseminada, el embolismo pulmonar, la trombosis venosa profunda y la trombosis asociada al cáncer (Khalafallah *et al.*, 2014).

B. PAPEL DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DE LA HEMOSTASIA

El endotelio es la barrera entre la sangre y los tejidos circundantes. Además de actuar como una barrera de separación evitando que la sangre entre en contacto con subendotelio vascular, su papel en la regulación de la hemostasia hace del endotelio un componente imprescindible para el correcto funcionamiento de todas las fases de este proceso y en la recuperación del tejido vascular (Wolinsky, 1980; Yau, Teoh and Verma, 2015).

En una situación fisiológica normal, participa en la homeostasis del flujo, mediante la regulación del tono vascular a través de la liberación de citoquinas como óxido nítrico y prostaglandina I₂ (Watson, 2009; Rauch and Paris, 2018), e inhibe el proceso de hemostasia, a través de la liberación de anticoagulantes como el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI, por sus siglas en inglés *Tissue Factor Pathway Inhibitor*), la trombomodulina y los proteoglicanos similares a la heparina (Watson, 2009; Esmon and Esmon, 2011; Yau, Teoh and Verma, 2015).

Cuando se produce una lesión vascular y se daña la capa endotelial, queda expuesto el subendotelio y las células endoteliales se activan. Inmediatamente comienza una rápida reacción en cadena de respuestas proinflamatorias y de reparación del vaso. En respuesta a esta situación, se secretan agentes vasoconstrictores, como la endotelina-1, que genera una disminución del flujo local. Al mismo tiempo, se activa el sistema de hemostasia, tal y como se ha descrito anteriormente, y se producen interacciones entre las plaquetas y el subendotelio, en las que también participa el endotelio. Las células endoteliales activas expresan una variedad de moléculas y receptores que

aumentan la respuesta plaquetaria y su adhesión al sitio de la lesión (Versteeg *et al.*, 2013), como por ejemplo, la exposición del Factor de von Willebrand que es esencial para la adhesión de las plaquetas al colágeno en los sitios de lesión vascular. El vWF forma cadenas largas en la superficie de las células endoteliales que establecen enlaces de alta resistencia con las plaquetas (Dubois *et al.*, 2007). Así se forma un agregado plaquetario que servirá de plataforma para los factores de la coagulación.

Tras la formación del tapón plaquetario, le sigue la activación del sistema de coagulación. Para la formación del coágulo estable, el endotelio desempeña un papel esencial en la generación de trombina a través de la expresión de factores procoagulantes que contribuyen con generación de trombina (Chen and Hogg, 2013). En la vía extrínseca de la cascada de la coagulación, las células endoteliales activadas expresan TF en la superficie celular (Bode and Mackman, 2015). Los mecanismos subyacentes de cómo las células endoteliales afectan la vía intrínseca actualmente no están claros, aunque se cree que células endoteliales pueden actuar como una barrera para los factores intrínsecos de la inhibición, pues se ha descrito que FXIIa está protegido de la inhibición por el inhibidor de C1 en presencia de células endoteliales (Schousboe, 2003).

Una vez que se tapiza la lesión, las células endoteliales participan en el proceso de fibrinólisis liberando moléculas profibrinolíticas para degradar el coágulo y metaloproteasas para escindir los agregados plaquetarios. Así, la secreción de t-PA activa el sistema fibrinolítico a través de la conversión de plasminógeno en plasmina en la sangre (Rijken and Lijnen, 2009) y cataliza la degradación de la fibrina dentro del coágulo (Collen and Lijnen, 2009). A su vez, el inhibidor de t-PA, PAI-1, es secretado también por las células endoteliales, de esta manera el endotelio no solo participa en la fibrinólisis sino que también en la regulación de este sistema (van Hinsbergh, 2001; Hiller, 2007; Sira, 2016).

Por otra parte, la disolución de los agregados plaquetarios está mediada por ADAMTS13, una metaloproteasa con afinidad específica por vWF, que es producida y liberada por el endotelio. Esta enzima escinde las cadenas de vWF y, en consecuencia, se elimina su unión con la pared endotelial (Chung and Fujikawa, 2002; Turner *et al.*, 2006).

Por último, las células endoteliales actúan en el proceso de curación del vaso, como ya se ha descrito, su participación en la angiogénesis es clave para la formación de nuevos vasos y el proceso de restauración de la pared vascular (Pearson, 1999; Hinsbergh, 2012).

7. LA HEMOSTASIA EN LA HHT

Como se ha descrito, las hemorragias son las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes de HHT. Desde hace décadas se han realizado estudios que tratan de dilucidar la causa de la intensidad de los sangrados, donde buscan alteraciones en la hemostasia en pacientes de HHT.

Algunos de estos estudios sugieren la presencia de una anomalía hemostática local. Un estudio realizado en muestras de piel y mucosa nasal, procedentes de biopsias de pacientes de HHT, describen que existe un aumento de los niveles del activador del plasminógeno (t-PA) en los vasos dilatados y telangiectásicos (Kwaan and Silverman, 1973). Esto implicaría una mayor actividad local de la fibrinólisis y un posible papel de esta proteína en los graves sangrados (Sureda *et al.*, 1991). Sin embargo, en este mismo estudio, en determinaciones consecutivas realizadas en estos mismos pacientes, el dímero D tenía niveles significativamente mayores en el 42,8% de los pacientes, mientras que el resto de los parámetros hemostáticos, con la excepción del aumento de los niveles de inhibidores del activador del plasminógeno, estaban dentro de los límites normales. Este hecho podría surgir de la presencia de depósitos de fibrina en las lesiones vasculares

telangiectásicas con una respuesta fibrinolítica local (Kwaan and Silverman, 1973; Sureda *et al.*, 1991).

Otros estudios describen anomalías en la función plaquetaria, concretamente en la agregación y adhesión de plaquetas *in vitro* (Muckle, 1965; Larsson, 1974; Endo *et al.*, 1984; Pandolfi and Ehinger, 2009). Sin embargo, estos resultados no se han confirmado en otros estudios, donde en todos los pacientes analizados, estos parámetros estuvieron dentro del rango normal (Steel *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 1991). Por otra parte, en algunas familias, se han encontrado asociaciones entre la HHT y la enfermedad de von Willebrand (Conlon *et al.*, 1978; Hanna *et al.*, 1984; Sugiura, Kawashima and Watanabe, 1991), donde existe una función anormal de las células endoteliales vasculares que puede dar lugar a una producción y liberación defectuosas del factor de von Willebrand (vWF) y, en algunos pacientes, lesiones telangiectásicas. Lo que implicaría una alteración en la hemostasia primaria y la consiguiente falta de respuesta ante una lesión vascular. Sin embargo, en otros estudios no se pudieron demostrar anomalías cuantitativas en la actividad del factor de von Willebrand.

En todos estos casos, estos resultados no se han reproducido en otras poblaciones de pacientes de HHT, por lo que la afectación de la hemostasia como causa de las hemorragias tan intensas nunca ha llegado a ser confirmada. Los estudios que presentan alteraciones en alguno de los parámetros de la actividad hemostática datan de hace décadas y no se encuentran resultados concluyentes más actuales. De hecho, entre los casos médicos de pacientes de HHT publicados, todos describen un perfil de coagulación y funcionalidad plaquetaria normales (Santos *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Amanzada *et al.*, 2010; Kamath *et al.*, 2015; Kiyeng *et al.*, 2016). Por esta razón, desde hace varias décadas y hasta la actualidad, se asume que el sangrado recurrente no se debe a ninguna alteración de la hemostasia, sino a la fragilidad de los vasos anormales formados fruto de

una mala angiogénesis (Hashimoto and Pritzker, 1972; Rahul K Shah, Dhingra and Shapshay, 2002).

Además, a la falta de consistencia de esos resultados, se le une el hecho de que los pacientes de HHT tienen un mayor riesgo de trombosis (Shovlin *et al.*, 2007). Ya en 1981, Bick declaró en un estudio en pacientes de HHT confirmados, que el 50% tenían un síndrome de coagulación intravascular diseminado (Bick, 1981). Éste es un síndrome adquirido caracterizado por la activación intravascular de la coagulación sin una localización específica y que se origina por una enfermedad subyacente que estimula una actividad procoagulante tan fuerte que produce un exceso de trombina, que supera los mecanismos anticoagulantes reguladores (Boral, Williams and Boral, 2016). Datos más actuales indican que un alto número de pacientes de HHT, 125 de 309 estudiados (Shovlin *et al.*, 2007), tienen niveles altos del factor FVIII. Según esos autores, hay una relación entre los niveles bajos de hierro, originados como consecuencia de las pérdidas hemorrágicas, y niveles plasmáticos elevados de factor VIII, lo que conlleva a un alto riesgo de tromboembolismo venoso (J. a Livesey *et al.*, 2012; Finsterer and Sehnal, 2015).

8. TRATAMIENTOS ACTUALES DE LA HHT

A pesar de que se conoce la etiología de la enfermedad, una mutación genética que lleva a la mala o inexistente función de alguna de las proteínas descritas relacionadas con la ruta de señalización de TGF- β , y que está aceptado que la deficiencia de alguno de los componentes de la superfamilia de TGF- β conlleva a la generación de telangiectasias y malformaciones vasculares como consecuencia de una mala angiogénesis y vasculogénesis, existe una gran laguna de conocimiento entre este hecho y la generación de cada una de las manifestaciones clínicas, pues se desconoce la secuencia de sucesos que llevan a la patogenia de la enfermedad.

Esto dificulta la generación de terapias eficaces que actúen en el origen de la enfermedad. En la actualidad no se disponen de tratamientos que reviertan las mutaciones que causan la enfermedad, por la complejidad del diseño, manejo y efectividad de las terapias génicas. A nivel molecular, la falta de conocimiento ha llevado a la inexistencia de terapias específicas que reviertan el fenotipo. Todo esto unido a la complejidad de diagnóstico y detección de manifestaciones clínicas que conlleva la HHT y al riesgo inherente de estos pacientes a sufrir trombosis obliga a los clínicos a tratar a estos pacientes según la situación individual de cada uno de ellos, tratando de paliar las manifestaciones clínicas que les afectan.

8.1. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES MUCOCUTÁNEAS Y SANGRADOS NASALES

El tratamiento de las epistaxis en pacientes de HHT tiene en cuenta los criterios de frecuencia, severidad y deterioro de la calidad de vida del paciente (Lund and Howard, 1999; Kühnel *et al.*, 2018).

El primer paso en la terapia de las epistaxis no es un tratamiento en sí, si no que consiste en la intervención a estos pacientes a través de terapias no farmacológicas que tratan de evitar la sequedad de la mucosa nasal, para mantenerla en el mejor estado y evitar su deterioro y formación de costras que llevan a la aparición de epistaxis. Esto se realiza mediante la aplicación diaria de cremas, aceites, férulas y aerosoles higroscópicos. Sin embargo, dependiendo del estado de algunos pacientes, el acto de aplicar un lubricante a veces es suficiente para desencadenar un evento de sangrado (McDonald, Bayrak-Toydemir and Pyeritz, 2011; Rimmer and Lund, 2015).

En ocasiones, cuando el sangrado persiste y es necesaria una detención rápida se utilizan tapones nasales, es una terapia de duración media-larga en la que actúan como compresores de la vasculatura local y, además, protegen a la nariz del trauma mecánico generado por la turbulencia de aire. Existe

una amplia gama de materiales, sin embargo, han de usarse materiales que no generen daños al retirarse. En general, tapones de superficie lisa y materiales como látex o polietileno, recubiertos con materiales hemostáticos, por ejemplo, carboximetilcelulosa (Sautter and Smith, 2016).

En cuanto a la terapia farmacológica, el único medicamento aprobado específicamente para su uso en HHT es el agente antifibrinolítico ácido tranexámico. Se ha demostrado que el ácido tranexámico reduce en número y severidad las epistaxis (Gaillard *et al.*, 2014). Por otro lado, ciertos antioxidantes, como la N-acetilcisteína oral, parecen reducir la frecuencia y la gravedad de las epistaxis, por lo que son una terapia recomendable debido a su bajo perfil de efectos adversos (de Gussem *et al.*, 2009). También se ha sugerido el uso de β -bloqueantes como el timolol que generan un retraso en la aparición de nuevas malformaciones. Su mecanismo de acción no está claro aunque se cree que podrían estar relacionadas con la vasoconstricción inmediata y posterior muerte celular endotelial, que conlleva la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (Rimmer and Lund, 2015).

Otra rama terapéutica es el uso farmacológico de agentes inhibidores de la angiogénesis. La eficacia de la administración sistémica de bevacizumab, como anticuerpo antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular, se ha confirmado para el tratamiento de HHT (Arizmendez, Rudmik and Poetker, 2015). Sin embargo, sus efectos adversos incluyen perforación GI, citopenia, hipertensión, cicatrización tardía de la herida y perforación del tabique. Estos efectos adversos, junto con el coste, han limitado su uso y se ha restringido a una terapia local (Rimmer and Lund, 2015). Hasta la fecha, la vía de administración local más efectiva es la inyección submucosa intranasal junto con la terapia con láser Nd: YAG (Rohrmeier, Sachs and Kuehnel, 2012).

En general, el procedimiento más extendido son las estrategias terapéuticas con medidas físicas contra las telangiectasias y lesiones nasales,

con el fin de eliminar los vasos anómalos y con ello la disminución de las epistaxis. La utilización de láseres para coagular las lesiones leves o moderadas de la mucosa nasal está muy extendida, debido a que produce un mínimo de inconvenientes, ya que se genera la coagulación de las telangiectasias individuales sin lesión en el espesor total de la mucosa (Kühnel *et al.*, 2018). El láser Nd: YAG pulsado (infrarrojo cercano a 1064 nm), el láser Nd: YAG de doble frecuencia (KTP, potasio-titanilfosfato, 532 nm), y los láseres de diodo han demostrado ser particularmente beneficiosos. Si la lesión en la nariz es más grave que una telangiectasia, se recomienda la coagulación con corriente alterna de alta frecuencia, es decir, la radiofrecuencia bipolar. Sin embargo, el tratamiento con láser es una solución temporal, ya que inevitablemente se forman nuevas telangiectasias (Donaldson *et al.*, 2015; Wirsching and Kühnel, 2017).

Tabla 3. Tratamientos de las lesiones mucocutáneas

NO FARMACOLÓGICA	FARMACOLÓGICA	RADIOLOGICA	INTERVENCIÓN QUIRURGICA
<i>Lubricantes</i>	Antifibrinolíticos	Laser Nd:YAG	Dermoplastia septal
<i>Tapones nasales</i>	Antioxidantes β-bloqueantes	Laser diodo	Procedimiento Young
	Inh. angiogénicos		

Es posible realizar terapias con efectos más duraderos en el tiempo. No obstante, todos ellos implican intervenciones quirúrgicas, que tienen un carácter mucho más invasivo. Cuando el sangrado es persistente, puede ser útil el uso de un material absorbible, como una esponja de gelatina empapada en adrenalina o ácido tranexámico (McDonald, Bayrak-Toydemir and Pyeritz, 2011). La dermoplastia septal de Saunders es un procedimiento diseñado para reemplazar la mucosa del tabique anterior de un paciente con un injerto de piel (Saunders, 1960). Los investigadores informaron de una reducción del 57% en la necesidad de un tratamiento con láser de

seguimiento durante un período de 5 años (Harvey, Kanagalingam and Lund, 2008). Por último, el cierre quirúrgico permanente de las cavidades nasales externas, o procedimiento de Young, es el último recurso (Lund and Howard, 1997). Este procedimiento está reservado para pacientes que tienen una reducción significativa en su calidad de vida debido a las epistaxis. Este evita el flujo de aire y las telangiectasias nasales del sangrado. Los pacientes que eligen someterse a este procedimiento deben respirar por la boca; por lo tanto, las lesiones orales o linguales sangrarán más que antes debido al aumento del flujo de aire (Rimmer and Lund, 2015; Peterson, 2017).

8.2. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES Y LOS SANGRADOS GASTROINTESTINALES

La manifestación clínica que deriva de las lesiones gastrointestinales suelen ser los sangrados gastrointestinales que conducen a anemia. Esta ha de tratarse con suplementos de hierro y si son muy severos, son necesarias las transfusiones repetidas de sangre (Kühnel *et al.*, 2018). Cuando el paciente no responde al tratamiento con hierro ha de localizarse la fuente de sangrado por endoscopia o arteriografía mesentérica (McDonald, Bayrak-Toydemir and Pyeritz, 2011).

Varios informes de casos y pequeños estudios no controlados han observado una disminución en la necesidad de transfusiones para tratar el sangrado GI grave después del uso de varios agentes farmacológicos como, el estrógeno-progesterona oral o el ácido tranexámico (Fernandez-L *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 2008). Además, algunos informes de casos muestran una disminución en el sangrado GI con la administración IV de bevacizumab, sin embargo, este último acarrea los efectos adversos mencionados en el apartado anterior (Flieger, Hainke and Fischbach, 2006). Terapias más invasivas, pero más eficaces, son la coagulación con sonda endoscópica del calentador o la coagulación con plasma de argón (Parambil, 2016).

8.3. TRATAMIENTO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS PULMONARES

Una vez que un paciente ha recibido un diagnóstico de HHT, el primer objetivo es evaluar al paciente para detectar AVM pulmonares. El primer paso en la detección de MAV pulmonar es la ecocardiografía transtorácica con contraste (Peterson, 2017). Una vez identificada, el método de tratamiento es la embolización que la realiza un radiólogo intervencionista. El riesgo que conlleva este procedimiento es que el 20% de los pacientes con embolización MAV pulmonares experimentan pleuritis (Greiben *et al.*, 2013).

8.4. TRATAMIENTO DE LAS MALFORMACIONES ARTERIOVENOSAS HEPÁTICAS

Las guías internacionales para el diagnóstico y manejo de la HHT recomiendan evitar la embolización de la arteria hepática debido a la morbilidad y la mortalidad significativas asociadas con este tratamiento. La embolización debe considerarse solo si la insuficiencia cardíaca del paciente no puede tratarse médicamente, consiste en varias sesiones escalonadas de terapia de embolización intervencionista (Chavan *et al.*, 2004). Incluso, el trasplante de hígado es una opción para pacientes con MAV hepáticas y necrosis biliar, insuficiencia cardíaca mal controlada o hipertensión portal refractaria (Garcia-Tsao, 2007; Peterson, 2017).

8.5. TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CEREBRALES

Se recomienda la resonancia magnética en adultos con HHT. Una vez detectada la MAV, las posibilidades terapéuticas incluyen la embolización transcáteter, radioterapia estereotáctica o microcirugía, para eliminar el

riesgo de futuros sangrados. Sin embargo, los riesgos asociados al tratamiento son muy elevados (Peterson, 2017).

9. CALIDAD DE VIDA DE LOS PACIENTES

Los síntomas derivados de la HHT como las telangiectasias, que tienen un factor estético importante, las manifestaciones derivadas de las malformaciones arteriovenosas que pueden conllevar problemas severos de salud y, sobre todo, los continuos sangrados derivados de estos afectan negativamente a la calidad de vida de los pacientes (Merlo *et al.*, 2014).

9.1. IMPLICACIÓN DE LAS HEMORRAGIAS EN LA VIDA DE LOS PACIENTES

Está descrito que las epistaxis, además de ser el signo más frecuente de la enfermedad, es para los pacientes la manifestación que más condiciona su calidad de vida pues afecta a más del 90% de los pacientes (Hussain, 1976; Zarrabeitia *et al.*, 2017; Kühnel *et al.*, 2018). El hecho de que las hemorragias sean tan frecuentes y abundantes ya en el periodo de vida activa completa, entre los 30 y los 60 años de vida, hace que perturbe su vida de manera física, emocional, social y laboral (Loaëc *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2018). Tal y como se ha descrito previamente, durante este periodo de edad es probable que los pacientes ya sufran al menos un sangrado diario y que la intensidad del sangrado sea de un grado moderado-alto (Silva *et al.*, 2013). Además de la incomodidad del paciente por las epistaxis, estas generan síntomas secundarios importantes, como es el alto riesgo de aparición de anemia ferropénica y la fatiga asociada a esta (Shovlin, 2010). Cuando no se responde a los tratamientos con suplementos de hierro, y las hemorragias no se controlan, es muy frecuente la administración de transfusiones de sangre de manera crónica. Esto agrava la situación del paciente por aumentar el

tiempo invertido en las repetidas visitas al hospital, ya que a menudo los pacientes se vuelven dependientes de las repetidas infusiones de sangre (Ingrand *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2014).

9.2. IMPLICACIÓN DE LAS MAV EN LA ESPERANZA DE VIDA

Por su parte, las MAV conllevan complicaciones, en ocasiones muy graves, como hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca o sucesos tromboembólicos, como infarto de miocardio, tromboembolia pulmonar o embolismo cerebral que puede derivar en paraplejia o muerte (Garcia-Tsao *et al.*, 2000; Sabbà, Gallitelli and Palasciano, 2001; Peterson, 2017).

No existe una cifra exacta de la esperanza de vida de estos pacientes. Sin embargo, todos los artículos coinciden en que está claramente disminuida con respecto a la población general, por la aparición de sucesos agudos derivados de complicaciones de las manifestaciones clínicas. Además, existe un riesgo de muerte acumulado en estos pacientes, pues la probabilidad se incrementa en las siguientes décadas por aumentar la prevalencia de las manifestaciones con la edad (Sabba *et al.*, 2006; Donaldson *et al.*, 2015; de Gussem *et al.*, 2016).

Ningún tratamiento actual puede prevenir el desarrollo de lesiones telangiectásicas o MAV en pacientes con HHT. La situación actual es la de reducir la carga de la enfermedad a través de la prevención para tratar de disminuir al máximo el deterioro de la calidad de vida de estos pacientes (Sabba *et al.*, 2006; de Gussem *et al.*, 2016). No obstante, la falta de especificidad de las terapias a menudo genera la imposibilidad cesar la progresión de los síntomas, lo que lleva al uso de terapias físicas y quirúrgicas que resultan muy invasivas y molestas (Harvey, Kanagalingam and Lund, 2008). Todo ello supone para el paciente una carga física y emocional que condiciona su calidad de vida.



HIPÓTESIS

“Only those who will risk going too far
can possibly find out how far they can go”

P.S. Enot

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS E HIPÓTESIS

Tal y como se ha desarrollado en el apartado de introducción, las hemorragias son la manifestación clínica más frecuente de la enfermedad de HHT. Además, es para los pacientes el síntoma más molesto y que más afecta a su calidad de vida. A este hecho se le suma un agravante, y es que no se dispone de terapias efectivas que eviten la aparición de ninguna de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

A pesar de que se conoce la etiología de la enfermedad, mutaciones en los genes que codifican componentes de la superfamilia del factor TGF- β , hoy día el campo de la terapia génica no está del todo desarrollado para ser lo suficientemente efectivo y seguro. Lo que se traduce en la ausencia de tratamientos génicos para la enfermedad de HHT. Por otra parte, se desconoce el mecanismo exacto por el que la deficiencia de cualquiera de estos genes genera las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Además, a pesar de la amplia importancia que tienen las hemorragias en la HHT, tampoco se ha confirmado si existe alguna alteración en el sistema de hemostasia que genere estos recurrentes y graves sangrados. Desde el inicio de la historia de la enfermedad, se ha tratado de la esclarecer las causas, pero nunca se obtuvieron resultados concluyentes y reproducibles. Hasta que finalmente, tras algunos avances en el conocimiento de la enfermedad, se postuló y aceptó que la deficiencia de la señalización de TGF- β llevaría a una deficiencia en la angiogénesis y como consecuencia se generarían las malformaciones vasculares. Un vaso mal formado implica mayor fragilidad y tortuosidad, generando un flujo anormal que llevaría a la rotura y aparición de las hemorragias. Se asumió esta teoría como válida y por supuesto nosotros la defendemos, no obstante, nuestra hipótesis es que esta fragilidad y rotura de los vasos sanguíneos explicaría la alta frecuencia de los sangrados, pero no lo difíciles de detener que a menudo son las hemorragias.

Es decir, que estos pacientes se encuentren en una situación donde la hemorragia no se detiene no es un problema de origen angiogénico, sino hemostático. Además, como se ha explicado anteriormente, los genes afectados en la HHT tienen una alta expresión en el endotelio, tejido que está descrito que tienen un papel imprescindible en la hemostasia, y, sin embargo, nunca se ha estudiado su implicación en relación a la HHT.

A partir, de toda la información recopilada y estudiada, nuestra hipótesis se basa en que la gravedad de los sangrados se debe a que sí existen alteraciones de la hemostasia. Y que, al contrario de lo que se ha tratado de demostrar anteriormente, no hay motivo para pensar que estén alterados componentes hemostáticos que no dependan del endotelio. Así, consideramos imprescindible estudiar todos los procesos del sistema de hemostasia en el que esté involucrado el endotelio para tratar de encontrar la etiopatogenia de los sangrados en la HHT.

The background of the entire page is a light gray technical drawing or blueprint. It features various mechanical components, including gears of different sizes, circles, rectangles, and lines. Some lines are solid, while others are dashed, indicating hidden parts of the drawing. There are also some numerical annotations and arrows scattered throughout the drawing.

OBJETIVOS

“Comfort zone is like a little bubble around you, push it in different directions and made it bigger until these objectives that seemed totally crazy eventually fall within the realm of the possible.”

Alex Honnold

OBJETIVO GENERAL

Este trabajo se centra en analizar si existen alteraciones en el sistema de hemostasia que justifique la dificultad para detener los abundantes sangrados inherentes a los pacientes de HHT.

Para ello, nos planteamos el siguiente objetivo general:

- Estudiar el sistema de hemostasia en dos modelos de ratón de la enfermedad de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, tipo 1 (HHT1) y tipo 2 (HHT2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para desarrollar el objetivo general planteado en esta tesis doctoral generamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar si los modelos de ratón tienen alteraciones del sangrado.
2. Investigar la función de endoglin sobre los componentes de la hemostasia.
3. Analizar el efecto de la deficiencia de ALK1 sobre las distintas fases de la hemostasia.

The background is a detailed technical drawing in pencil or light grey. It features various mechanical components, including gears of different sizes, shafts, and rectangular parts. There are numerous dimension lines with arrows and numerical values such as '22.244', '26', '48.5', '11', '15', and '20'. The drawing is a complex assembly of lines, circles, and hatching, typical of engineering blueprints.

MATERIALES Y MÉTODOS

“Llegar a la cima no es nada,
la manera en la que lo haces lo es todo”

Royal Robbins

MATERIALES

Los reactivos, anticuerpos, materiales, equipos y programas informáticos empleados para la realización de esta tesis doctoral están recogidos en las [Tabla 7 - 11](#) situadas al final del apartado de “Materiales y Métodos”.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los animales de experimentación descritos en este trabajo son ratones de fondo genético C57BL/6J. Los experimentos se han realizado en ratones heterocigotos para el gen *Eng* (*Eng*^{+/-}), que codifica la proteína endoglina, o en ratones heterocigotos para el gen *Alk1* (*Alk1*^{+/-}), que codifica la proteína quinasa similar al receptor de activina tipo 1 (Alk1). Como controles se han utilizado ratones de genotipo silvestre, los hermanos de camada homocigotos *Eng*^{+/+} y *Alk1*^{+/+}, respectivamente.

Ambas líneas de ratón actúan como modelo genético de la enfermedad Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Los ratones *Eng*^{+/-} a los que les falta una copia del gen *Eng*, son modelo del subtipo 1 de la enfermedad HHT (HHT1), mientras que los ratones *Alk1*^{+/-} deficientes en una de las copias de *Alk1* son modelo del subtipo 2 de la enfermedad (HHT2).

Además, para este trabajo se han utilizado ratones que sobreexpresan el gen humano de endoglina (C57BL/6J-Tg (*ENG*)) denominados en este trabajo *ENG*⁺. Como controles, se utilizaron ratones C57BL/6J de genotipo silvestre o *wild type* (WT).

Todos los procedimientos se han realizado en paralelo con las líneas de ratones descritas y sus controles, en todos los casos se han utilizado ratones machos y hembras, de 6 a 12 meses.

1.1. MODELO DE RATÓN HHT₁. RATONES DEFICIENTES EN ENDOGLINA (*Eng*^{+/-})

Los ratones heterocigóticos para el gen de endoglina (*Eng*^{+/-}) fueron cedidos por la Dra. Michelle Letarte (Universidad de Toronto, Canadá). Para la generación de estos ratones, se diseñó un vector pPNT que contiene una región de recombinación homóloga 5' de un fragmento de endoglina de ratón (5'-HR), un *cassette* LacZ (LacZ), un *cassette* de Neomicina (Neo, utilizado para la selección positiva), una región de recombinación homóloga 3' (3'-HR) y un *cassette herpes simplex thymidine kinasa* (tk, utilizado para la selección negativa). De tal forma que los genes LacZ y Neo reemplazan una región de 609 bp que contiene el *codon* de inicio de *Eng*.

El constructo se linealizó y se introdujo por electroporación en células madre embrionarias de la cepa 129/Ola. Se seleccionaron las colonias negativa y positivamente con G418 y ganciclovir y neomicina. Las colonias de células madre embrionarias positivas se introdujeron en blastocistos de la cepa C57BL/6 que, finalmente, dio lugar a la primera generación de ratones *Eng*^{+/-} (Bourdeau, Dumont and Letarte, 1999).

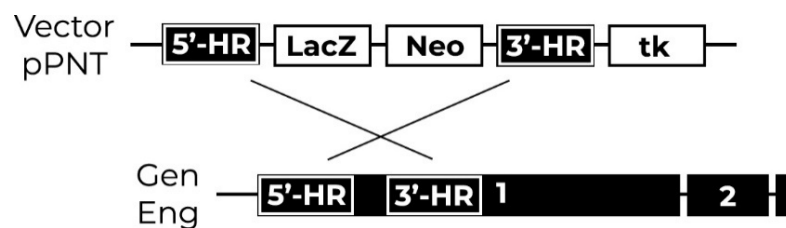


Figura 12. Diseño del constructo vectorizado para la generación de ratones deficientes en endoglina. En negro se representan las secuencias de origen murino (Gen de *Eng* y secuencias homólogas) y en blanco las secuencias vectoriales. Modificada de (Bourdeau, Dumont and Letarte, 1999).

1.2. MODELO DE RATÓN HHT2. RATONES DEFICIENTES EN *Alk1*^{+/-}

Los ratones heterocigotos de *Alk1* (*Alk1*^{+/-}) fueron cedidos por el Dr. Peter ten Dijke (*Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda*) y generados en el laboratorio de Paul Oh (*Barrow Neurological Institute, University of Florida, CA, Estados Unidos*).

Estos ratones se generaron insertando un *cassette* de PGK-neo-poly (A) en el sitio XhoI del exón 7 (codifica el subdominio V de *Alk1*) mediante enzimas de restricción, usando células no diferenciadas (células madre) embrionarias de ratones 128/Ola, por Oh y colaboradores (Oh y cols., 2000) y por cruce con la cepa C57BL/6. Como consecuencia de esta mutación estos ratones presentan una disminución funcional del receptor *Alk1* (Hong y cols., 2007).

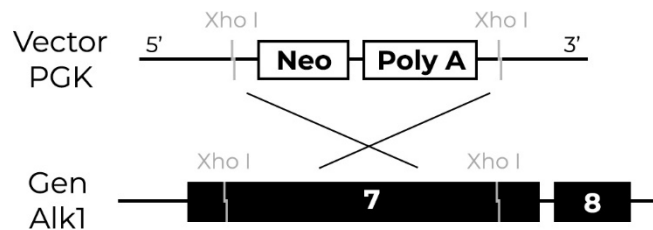


Figura 13. Constructo para la generación de ratones *Alk1*^{+/-}. La secuencia del vector PGK se introduce en el exón 7 del gen de *Alk1* por medio de la enzima de restricción Xho I.

1.3. RATONES QUE SOBREENPRESAN ENDOGLINA HUMANA (*ENG*⁺)

Para generar los ratones que sobreexpresan endoglina se inyectó en un óvulo fecundado, procedente de ratones CBAxC57BL/6J, un vector pCAGGS que contiene la secuencia de ADN complementario (ADNc) de la isoforma larga de endoglina humana (h-L-Endoglina). Se incluyó la secuencia de ADNc y no el ADN genómico para evitar que se genere por *splicing* alternativo la isoforma corta de endoglina (h-S-endoglina). Este vector fue construido en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabéu (Centro de

Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). Para su generación, se utilizó un constructo formado por la secuencia líder de endoglina, seguida por el epítipo de la hemaglutinina de virus influenza y el ADNc maduro de endoglina en un vector pcEXV. Tras la digestión con enzimas de restricción, el fragmento se insertó en un plásmido pCAGGS bajo el control del promotor de actina, de expresión ubicua. Este plásmido es además portador de la secuencia amplificadora del virus mosaico de la coliflor (CVM, del inglés *Cauliflower Mosaic Virus*), otro amplificador más un intrón y una secuencia de poli-A del gen de la β -globina (β G) (Oujo *et al.*, 2014).



Figura 14. Construcción genética para la generación de ratones *ENG*⁺. Modificado de (Oujo *et al.*, 2014).

Para la obtención de fragmentos lineares para la microinyección, este vector fue digerido con las enzimas de restricción y se purificó el fragmento de interés, portador del gen de endoglina, de 5,2 Kb, mediante electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, los óvulos fecundados fueron inyectados en hembras gestantes en el Servicio de Transgénesis (NUCLEUS, Universidad de Salamanca, Salamanca). Los animales transgénicos fundadores se retrocruzaron con ratones C57BL/6J para perpetuar la línea transgénica.

1.4. MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA), en un animalario con barrera libre de patógenos (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*) y condiciones ambientales controladas; a 20°C de temperatura, 60% de humedad ambiental y 12 horas de fotoperiodo. Todos los animales tuvieron acceso libre a agua y comida estándar.

La manipulación, cuidados y utilización de los animales de experimentación se realizaron siguiendo la normativa expuesta en la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RC1201/2005 y RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

1.5. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS ANIMALES

El genotipo de los ratones se determinó mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de *Polymerase chain reaction*), para ello, en el momento del destete, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en tampón de lisis durante 24 horas a 55°C. Después se hirvió durante 10 minutos y se centrifugó a 12 400 g durante 10 minutos. El sobrenadante de la digestión, que contiene el ADN genómico del tejido, se empleó para amplificar una región específica para cada uno de los genes de interés. Para ello, se utilizaron unos cebadores específicos de cada uno de los genes (Tabla 4), ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y el tampón de reacción. Esta reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador.

Tabla 4. Cebadores utilizados para el genotipado de los ratones.

GEN DIANA	SECUENCIA DE LOS CEBADORES (5' - 3')	TEMPERATURA ANILLAMIENTO (°C)
<i>h-ENG</i>	TGAAGCCACGAATGTTTTCT	F
	AGAGCATCCTCCTCCGACTGG	R
<i>Eng</i>	TACCTCTGGATACCGGATAAG	F
	AAGTTTGGCATCCTATGAAAC	R
<i>Alk1</i>	GTGGCTGGAGAGGAACAGTAG	F
	GCAACATCCACTGAGGAGCAG	R

El producto de PCR se resuelve en un gel de agarosa y se visualizan las bandas correspondientes a los genes amplificados, mediante el transiluminador GelDoc y el software Quantity One.

2. TÉCNICAS GENERALES DE MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Todos los procedimientos experimentales realizados en animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Salamanca (número de proyecto 305).

2.1. ANESTESIA DE LOS ANIMALES

En todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo se requirió anestesia que se administró por vía inhalatoria. Para inducir el estado anestésico del ratón se utiliza una dosis alta de isoflurano 5% en flujo de oxígeno. Posteriormente, se mantiene en estado inconsciente con un flujo de oxígeno que contiene una concentración de 1,7-2% de isoflurano. Finalmente, al terminar el procedimiento experimental, se devuelve al animal a un ambiente libre de anestésico y con aporte de calor. Si fuese necesario, se administra una dosis de analgésico, este procedimiento está descrito en el apartado “Administración subcutánea de analgésicos”.

En algunas ocasiones, tras terminar algunos procedimientos experimentales, es necesaria la eutanasia del ratón, para evitar el sufrimiento de este. Esto se desarrolla en el apartado de “eutanasia de los animales de experimentación”.

2.2. EXTRACCIONES DE SANGRE

2.2.1. Anticoagulantes utilizados

Los anticoagulantes son sustancias que interrumpen el proceso de hemostasia, en este trabajo se han empleado tres tipos distintos. Según el procedimiento experimental que se lleve a cabo se elige un anticoagulante

que sea compatible con el experimento y sobre todo que su mecanismo de acción no interfiera con la técnica de detección.

Citrato sódico

El citrato sódico o ácido 1,2,3-propanetricarboxílico es una sal trisódica que interacciona con el calcio formando complejos quelados. Tal y como se ha descrito en la introducción, los iones de calcio (Ca^{2+}) participan en la activación plaquetaria, así el secuestro de estos iones impediría la hemostasia primaria y por consiguiente los procesos de coagulación sucesivos (Figura 15).

Este anticoagulante se utiliza en una solución de trabajo del 3,8% y en una proporción 1:9 con respecto a la sangre (Mann *et al.*, 2007).

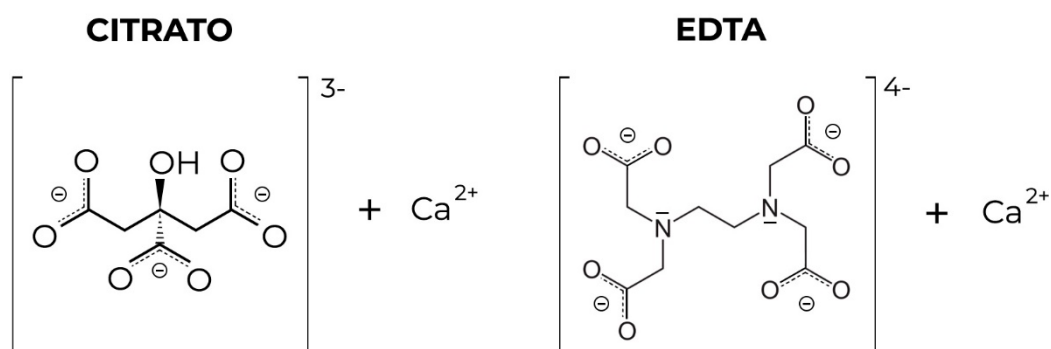


Figura 15. Molécula química del citrato sódico y EDTA. Relación estequiométrica con el calcio.

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El EDTA es una sal sódica con actividad anticoagulante, su mecanismo de acción es similar a la del citrato sódico, por ser un agente quelante del calcio que impide la activación plaquetaria y, por consiguiente, todos los procesos de coagulación que se desencadenan posteriormente. A diferencia del citrato, el EDTA tiene una acción complejante muy potente, por lo tanto, la cantidad de EDTA necesaria para ejercer una acción anticoagulante es mucho menor que la de citrato (Figura 15) (Reardon, Warner and Trowbridge, 1991).

Se utiliza en una concentración *stock* de concentración 10%, y tan solo es necesario impregnar en EDTA todo el material que vaya a estar en contacto con la sangre para evitar la coagulación de esta.

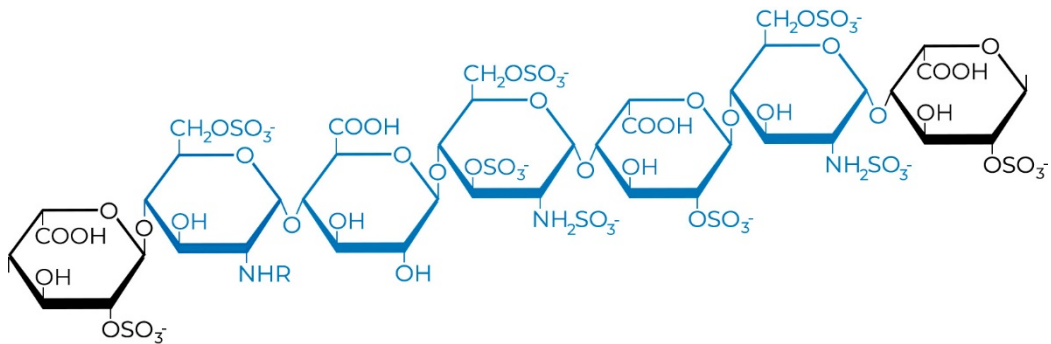
Heparina sódica

La heparina sódica es un polímero de aminoglicanos sulfatados aniónicos que contiene en su estructura una secuencia pentasacárida esencial para su mecanismo de acción. Esta secuencia le confiere a la heparina gran afinidad por muchas proteínas, sin embargo, su acción más importante la ejerce sobre la antitrombina (Warnock and Huang, 2019).

Al unirse a la antitrombina, heparina genera un cambio en la conformación de la antitrombina potenciando y acelerando su actividad inhibitoria. La antitrombina genera su actividad inhibitoria a través de su unión con diferentes factores de la cascada de coagulación, FXIIa, FXIa, FXa, FIXa, FVIIa, aunque su ligando principal es la trombina (FIIa). La diferente conformación generada por la acción de heparina hace que la arginina, del sitio reactivo de la antitrombina, esté más accesible para el centro activo de la trombina. Así se potencia la actividad neutralizadora de antitrombina y evita la proteólisis de fibrinógeno a fibrina en presencia de trombina, ver [Figura 16](#). En definitiva, evita la formación de coágulos (Rosenberg and Damus, 1973; Mulloy *et al.*, 2016).

Se utiliza a partir de la solución stock que proporciona la casa comercial [1 000 UI/ml] y se diluye a una concentración de trabajo de 1 UI/ml.

SECUENCIA DE HEPARINA
PENTASACARIDO



MECANISMO DE ACCIÓN

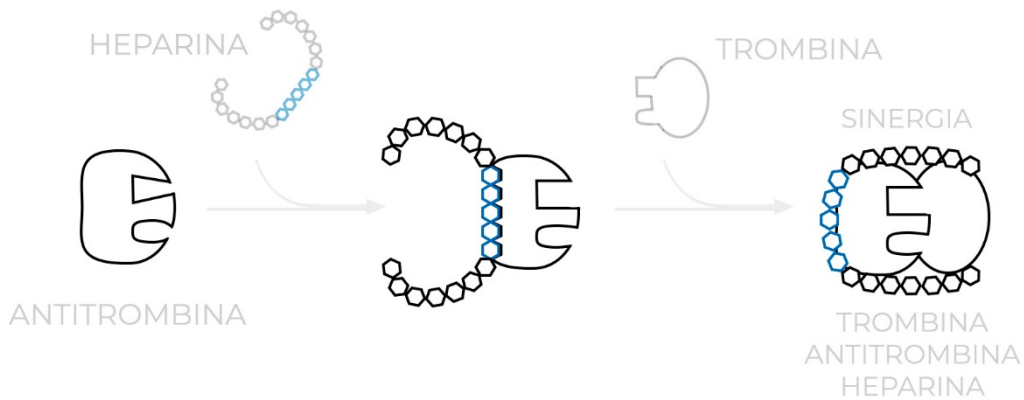


Figura 16. Estructura del pentasacárido de la heparina y su mecanismo de acción. La heparina contiene en su estructura un pensatasacárido con capacidad de unirse a la antitrombina. Cuando se forma este complejo facilita y estabiliza su unión a la trombina. Modificado de (Mulloy et al., 2016).

2.2.2. Extracción de sangre a través del corazón

Se coloca al animal en posición decúbito supino tras ser anestesiado. Se pulveriza etanol al 70 % de concentración sobre la piel del animal y se seca con una toalla de papel. Se sitúa la punta de una aguja de 23 G, acoplada a una jeringa de 1 ml, justo por debajo del apéndice xifoides. La aguja ha de entrar casi paralela al eje central del ratón, ligeramente dirigida hacia la parte izquierda del animal, hacia el corazón. Se presiona la piel con la aguja hasta que se atraviesa. Tras dejar de notar la resistencia que opone la piel, se genera presión negativa dentro de la jeringa retirando ligeramente el embolo hacia

atrás. Se mueve la aguja en la dirección señalada y se detiene el movimiento en el momento en que comienza a entrar sangre dentro de la jeringa. Se aspira la sangre lentamente para permitir el retorno venoso y llenado cardíaco, además de para evitar la hemólisis, hasta completar la capacidad de la jeringa o notar una parada de la entrada de sangre (Figura 17). Se extrae la aguja del interior del corazón y la sangre se deposita dentro de un tubo impregnado con el anticoagulante determinado por el procedimiento experimental.

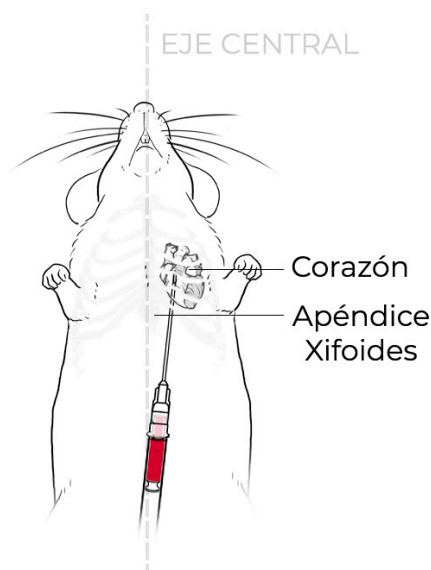


Figura 17. Procedimiento experimental de extracción de sangre intracardiaca. Situación de la aguja para la punción cardiaca.

2.2.3. Extracción de sangre del plexo retroorbital

Tras anestesiarse al ratón, se coloca en posición decúbito lateral. Se aplica presión con los dedos para retirar ligeramente la piel hacia la parte posterior de la cabeza hasta que el globo ocular sobresale parcialmente. En este momento, se introduce cuidadosamente un capilar heparinizado por detrás del globo ocular, una vez situado en la base del ojo, se gira el capilar sobre sí mismo hasta que el borde de vidrio rompe el seno venoso y comienza a sangrar. La sangre asciende por el tubo de vidrio por capilaridad y, cuando alcanza el tope señalado, se tapona el extremo superior con el dedo y se retira

el capilar, ver [Figura 18](#). Finalmente, la sangre se deposita en un tubo heparinizado y se procede con el experimento correspondiente.

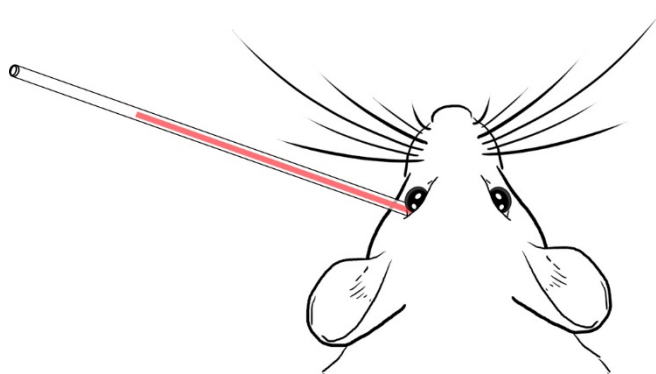


Figura 18. Procedimiento para extracción de sangre en el plexo retroorbital por capilaridad.

2.2.4. Extracción de muestras de sangre de la vena yugular

Se coloca al ratón anestesiado en posición decúbito supino. Se realiza un pequeño corte en la piel a uno de los lados de la parte superior del torso, a la altura del cuello. Por disección roma, se separan los tejidos con unas pinzas hasta encontrar la yugular.

Para extraer la muestra de sangre se utiliza una cánula acoplada a una jeringa de 1 ml impregnada en el anticoagulante. La cánula está formada por un tubo de polietileno de 0,58 mm de diámetro unida por un extremo a una aguja de 30 G y por el otro a una aguja de 23 G. La punta de la aguja de 30 G se clava en el paquete muscular que queda justo por debajo de la yugular, a pocos milímetros de la vena. Se atraviesa el músculo en dirección al vaso hasta que se observa que el extremo biselado de la aguja se encuentra dentro del vaso, ver [Figura 19](#). En este momento, se aspira la sangre muy lentamente para que la pared del vaso no tapone la entrada de la aguja. Por último, se saca la cánula, se retira de la jeringa y la muestra de sangre se introduce en un tubo impregnado en el anticoagulante determinado por el procedimiento experimental. En este caso, se utiliza EDTA como anticoagulante.

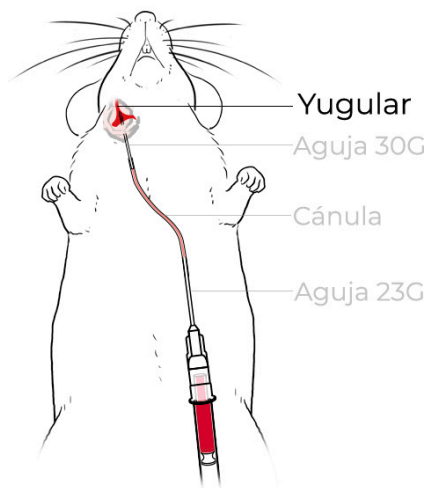


Figura 19. Procedimiento para la extracción de sangre a partir de la vena yugular.

2.3. ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

2.3.1. Administración intravenosa de agentes procoagulantes a través de la vena yugular.

El procedimiento de inyección en la vena yugular es similar al de “extracción de muestras de sangre en vena yugular”, a excepción de algunos pasos:

Antes de situar la cánula en el interior de la yugular, se elimina el volumen de aire contenido en la cánula y la jeringa con suero fisiológico. Para ello, se absorbe una cantidad indefinida de suero, se elimina todo el contenido de aire y se enrasa a un volumen determinado. Posteriormente, se absorbe la dosis de solución del agente desencadenante del proceso de hemostasia.

Antes de inyectar el volumen de fármaco, se llevan a cabo los procesos descritos en el apartado “extracción de muestras de sangre en la vena yugular”. Al introducir la cánula 30 G en la yugular, se inyecta lentamente la dosis determinada para cada ratón, que se describen en el apartado “Dosis de los agentes desencadenantes de la hemostasia”, manteniendo dentro de la jeringa el volumen de suero fisiológico inicial. Finalmente, se cierra la herida

con puntos de sutura, se aplica povidona iodada sobre la herida y se administra analgésico por vía subcutánea.

Dosis inyectada de los agentes desencadenantes de la hemostasia

En este procedimiento experimental se utiliza el colágeno como principal agonista desencadenante del proceso de hemostasia. Como se ha descrito, el colágeno es una proteína que participa activamente en el proceso de hemostasia. En contacto con las plaquetas, facilita su adhesión e induce su activación y consiguiente agregación, desencadenando así todo el proceso hemostático. Su mecanismo de acción se encuentra descrito con más detalle en el apartado de introducción de este trabajo. Además, en este procedimiento se administra en combinación con epinefrina que actúa como agonista potenciando la respuesta por aumentar el ritmo cardíaco. Así, facilita una distribución rápida del colágeno, consiguiendo una respuesta más rápida y, al mismo tiempo, evita la acumulación de colágeno en una zona, ya que nos interesa estudiar la respuesta a nivel sistémico.

La dosis de ambos fármacos viene determinada por el peso del ratón, de tal manera que se utiliza una concentración de 150 ng colágeno/ 15 ng epinefrina / g ratón.

2.3.2. Administración local de cloruro férrico en la superficie de la arteria carótida

Para administrar el cloruro férrico, hay que exponer la carótida al exterior mediante procedimientos quirúrgicos. Se coloca al ratón anestesiado en posición decúbito supino. Se realiza un pequeño corte en la piel a uno de los dos lados donde se sitúa la tráquea. Y por disección roma se separan los tejidos, hasta que se aísla la carótida de todos los tejidos colindantes, sin seccionarla. La carótida se encuentra por detrás de la tráquea a uno de los lados de esta. Una vez aislada, se coloca una pieza de plástico curva justo por debajo, de manera que evite el contacto directo con el resto de los tejidos,

a excepción del sistema circulatorio. Esto es necesario, porque el cloruro férrico (FeCl_3) es muy hidrofílico, y debido al daño en los tejidos, generados por la manipulación quirúrgica, estos tienden a supurar líquidos.

Para aplicar el cloruro férrico sobre la superficie de la carótida, se impregna un papel de filtro de 1x2 mm en una disolución de FeCl_3 [7,5 %] en suero salino que se coloca sobre la superficie aislada del vaso durante 1 minuto. Pasado este tiempo, se retira el papel y se añade una gota de suero salino sobre la zona de intervención para evitar que se sequen los tejidos.

2.3.3. Administración subcutánea de analgésicos

Después de los procedimientos experimentales de administración de agentes procoagulantes y extracción de sangre a través de la vena yugular. Se administra por vía subcutánea el fármaco analgésico, Buprenorfina. Se coloca al ratón en posición decúbito prono y se separa un pellizco de piel en la zona del cuello. Con una aguja de 25 G acoplada a una jeringa se atraviesa la piel y se inyecta una dosis de 0,1 mg buprenorfina / kg de ratón.

2.4. EUTANASIA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los animales se llevaron a término tras realizar cada uno de los procedimientos definidos en este trabajo, a excepción del procedimiento experimental de tiempo de sangrado. Ésta es una técnica de experimentación con grado de sufrimiento leve, ya que la recuperación de los ratones tras esta técnica es rápida y apenas indolora.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo. Además, utilizamos como referencia las recomendaciones dictadas por la Asociación Médica de Veterinaria Americana (AVMA, del inglés *American*

Veterinary Medical Association). En todos los casos se lleva a cabo la eutanasia del animal por dislocación cervical, siempre antes de que despierten del estado de anestesia, para evitar cualquier sufrimiento al ratón, con la única excepción de los ratones sacrificados para la obtención de células endoteliales de cultivo primario. En este caso, los ratones se sacrifican por dislocación cervical sin haberles inducido un estado de anestesia, para evitar posibles daños en el endotelio de los pulmones de estos.

3. EXPERIMENTOS REALIZADOS *IN VIVO*

3.1. TIEMPO DE SANGRADO

El tiempo de sangrado o *bleeding time* es un procedimiento que permite analizar el tiempo necesario para detener una hemorragia provocada y reproducible. Es una técnica muy extendida, utilizada para determinar patrones de sangrado (Dejana *et al.*, 1979; Saito *et al.*, 2016).

Se anestesia al animal y se mantiene su temperatura corporal durante todo el proceso con una manta eléctrica. Se coloca al ratón en posición decúbito prono y se provoca la hemorragia cortando con unas tijeras el extremo terminal de la cola. Para que el corte sea reproducible en todos los ratones se utiliza una pieza guía que indica el punto de la cola más cercano al extremo con un diámetro de 1,40 mm. Se coloca la pieza fija y se corta la sección del extremo. Inmediatamente, comienza la hemorragia, y para que se visualice mejor se introduce la cola en un tubo que contiene suero salino a 37 °C. El investigador anota durante un máximo de 30 minutos el caudal de sangre que se está eliminando en todo momento, este se cuantifica en una escala del 0 al 5 según el grado de severidad, siendo 5 una cantidad muy cuantiosa y 0 no se está perdiendo sangre. Finalmente, se obtiene un registro del sangrado como el del ejemplo de la [Figura 20](#). Cabe destacar que pueden existir dos situaciones en las que el investigador detenga el experimento antes de los 30

minutos pautados. En primer lugar, si el sangrado se detiene por completo durante 5 minutos consecutivos, el observador asume que la hemorragia ha cesado por completo. Y, por otra parte, si ocurre que el sangrado no cesa en ningún momento o tiene un sangrado continuo durante más de 15 min, el investigador ha de detener el experimento y ayudar a que se detenga la hemorragia, taponando y presionando la herida. De esta manera se disminuye el sufrimiento del ratón y ayuda a su completa recuperación.

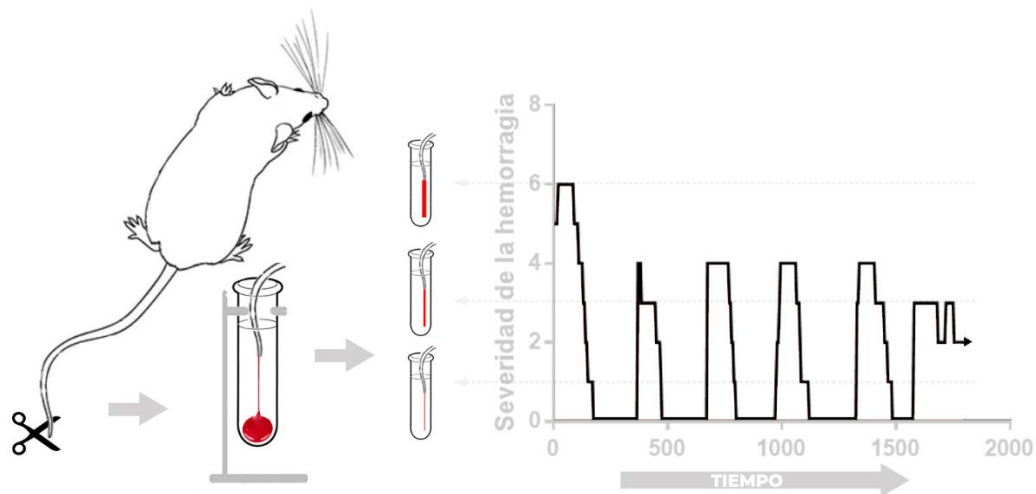


Figura 20. Procedimiento y patrón de sangrado. Se corta el extremo de la cola del ratón y se introduce en un tubo con salino. Se observa la cantidad de sangre en cada tiempo y se genera una gráfica que representa el patrón de sangrado de ese ratón.

Desde el corte, la cantidad de sangre va disminuyendo hasta que la hemorragia cesa, el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia desde el momento del corte de la cola se denomina primer tiempo de sangrado o *first bleeding time*. Es común que la hemorragia vuelva a iniciarse tras pocos segundos, los sangrados siguientes al primer tiempo de sangrado se denominan resangrados o *rebleeding*. Por último, el tiempo total que el ratón sangra, es decir, la suma del primer tiempo de sangrado y los resangrados, se denomina tiempo total de sangrado o *total bleeding time*, ver [Figura 21](#).

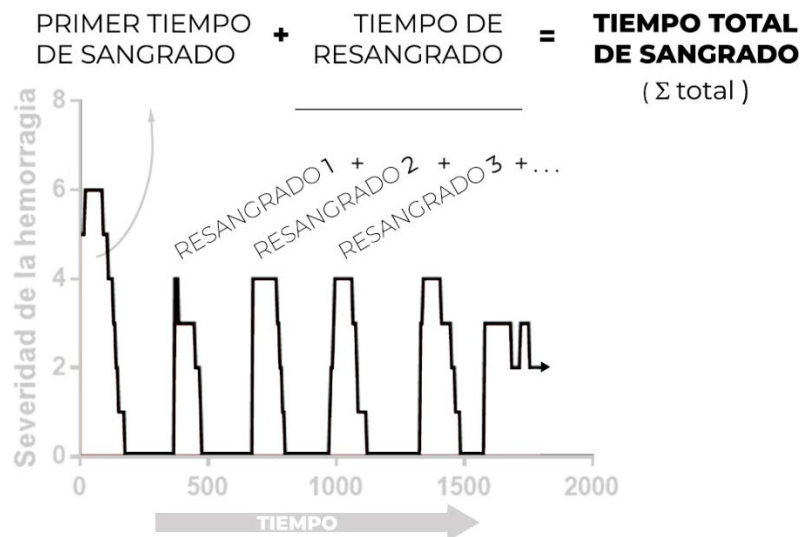


Figura 21. Conceptos de tiempos de sangrado. El primer tiempo de sangrado es el periodo desde el inicio de la hemorragia hasta que se detiene por primera vez. El resto de periodos donde la hemorragia está activa se conoce por tiempo de resangrado. La suma de ambos es el tiempo total de sangrado.

Debido a que es el investigador el que cuantifica el grado de severidad de la hemorragia, estos experimentos se han realizado en ciego, es decir, el investigador desconoce el genotipo del ratón que está interviniendo.

3.2. TROMBOGÉNESIS SISTÉMICA AGUDA INDUCIDA POR COLÁGENO Y EPINEFRINA

En este procedimiento experimental se induce una trombogénesis aguda a nivel sistémico mediante la administración intravenosa de agonistas procoagulantes en dosis subletal. Es una modificación de una técnica muy extendida que nos permite estudiar distintos parámetros implicados en el proceso de hemostasia (DiMinno and Silver, 1983; Miyazawa *et al.*, 2019).

Inducción sistémica de la trombogénesis aguda

Con el animal anestesiado, obtenemos una muestra basal de sangre (150 – 250 μ l) a través de la vena yugular. En todos los casos, cada muestra se adquirirá siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de “extracción

de muestras de sangre de la vena yugular” utilizando EDTA como anticoagulante.

Tras tomar una muestra basal, se administra una mezcla subletal de colágeno y epinefrina [150 ng colágeno / 15 ng epinefrina / g ratón] según lo descrito en el apartado de “administración intravenosa de agentes procoagulantes a través de la vena yugular” para inducir la activación de las plaquetas y por consiguiente todo el proceso de hemostasia.

3.2.1. Estudio trombocitopenia inducida

Para analizar la capacidad de agregación de las plaquetas se compara el número de plaquetas libres circulantes (no agregadas) de la muestra basal, con el número de plaquetas que se encuentran libres tras sufrir una activación por colágeno. Tras inducir ese estado activado de las plaquetas estas se agregan y, por consiguiente, el número de plaquetas libres circulantes disminuirá.

Procedimiento

Tras la “Inducción sistémica de la trombogénesis aguda”, previsiblemente las plaquetas se activarán y se agregarán, y, transcurridos 3 minutos de trombosis se recoge una nueva muestra de sangre. Todas las muestras se analizan mediante un hemocitómetro (ADVIA™ 120 hematology, Bayer). Este nos da información de todas las poblaciones celulares de la sangre, incluido el valor de PLT que es la concentración de plaquetas de la muestra, ver [Figura 22](#).

Este dato permite comparar el número de plaquetas libres antes y después de que sufran la inducción de una trombogénesis sistémica.

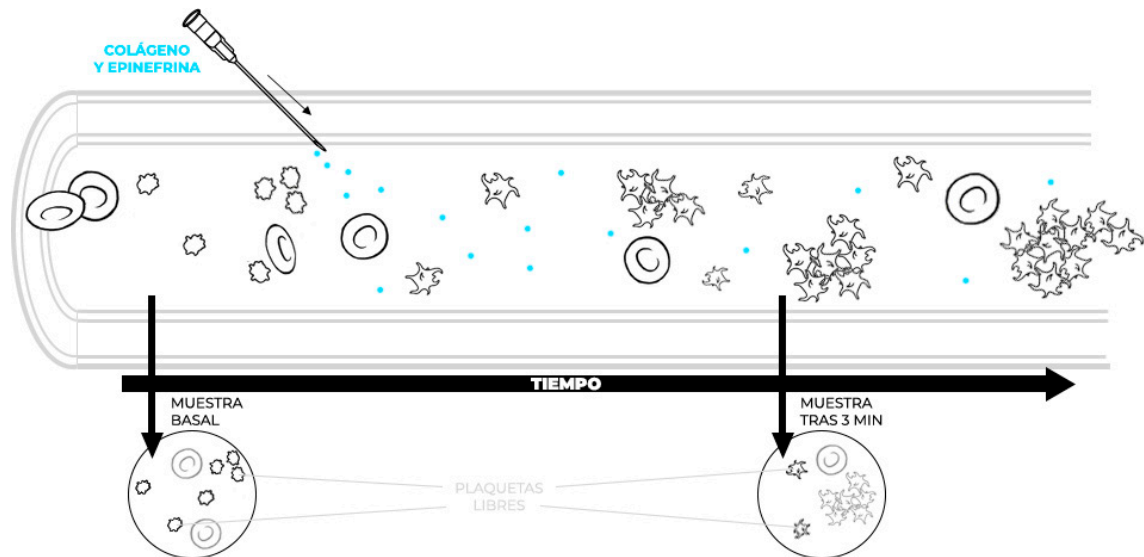


Figura 22. Inducción de un evento trombótico por administración de colágeno y epinefrina. Las muestras de sangre a analizar se toman antes y tres minutos después de la inyección.

3.2.2. Estudio de los componentes principales de la fibrinólisis

Como consecuencia de la activación del estado protrombótico inducido por el colágeno, se libera fibrina, imprescindible para la formación de coágulos. En presencia de fibrina, tiene lugar la cascada de la fibrinólisis.

Para estudiar la fibrinólisis, se analizan los niveles proteicos de los principales componentes del proceso de la fibrinólisis tras inducir un estado de trombogénesis aguda (Ver “Inducción sistémica de la trombogénesis aguda”). Se toman muestras de sangre antes de la administración de colágeno y epinefrina (muestra basal) y tras 30 min, 8 h y 24 h desde el momento del *bolus IV*. La muestra se centrifuga 15 min a 1 000 g y 4 °C de temperatura, tal y como describe el kit de ELISA con el que se analizará la muestra. Hasta entonces, la muestra se mantiene a -80 °C.

3.3. ESTUDIO DE LA TROMBOSIS LOCAL INDUCIDA POR CLORURO FÉRRICO

Este procedimiento experimental permite analizar *in vivo* y a tiempo real la formación y crecimiento de un trombo que se genera de manera localizada en el interior de la arteria carótida (Eckly *et al.*, 2011).

Procedimiento

Tras inducir la anestesia del ratón por vía inhalatoria, se coloca en posición decúbito supino y se expone la carótida al exterior tal y como se describe en el apartado “Administración local de cloruro férrico en la superficie de la arteria carótida”. Se coloca una sonda Transonic® Flowprobe que mide el flujo que pasa por el vaso sanguíneo para hacer un seguimiento a tiempo real de la cantidad de sangre que pasa por la carótida. Esta se sitúa en la parte superior de la zona aislada de la carótida, en una zona posterior de donde se inducirá el daño vascular por acción del cloruro férrico, ver [Figura 23](#).

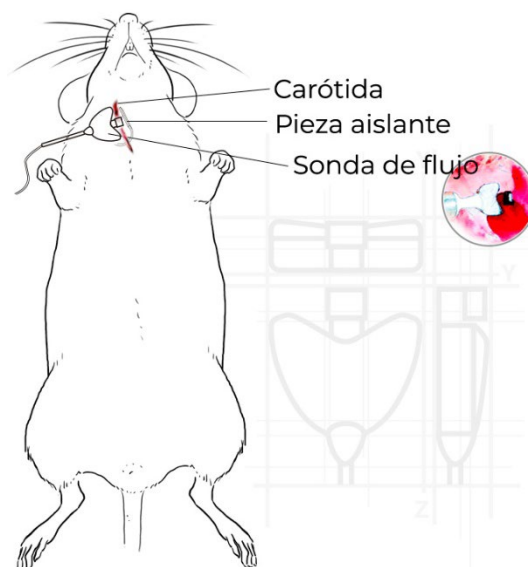


Figura 23. Esquema de la colocación de la sonda. La carótida se aísla de tejidos colindantes con una pequeña pieza circular y posteriormente se conecta la sonda, en forma de gancho, rodeando la carótida.

Inducción local del trombo por cloruro férrico

La utilización de Cloruro Férrico (FeCl_3) para iniciar el proceso de hemostasia es una técnica extendida y aceptada para estudiar el mecanismo de formación de trombos (Eckly *et al.*, 2011). No está claro el mecanismo de acción del FeCl_3 , aunque está descrito que el FeCl_3 causa estrés oxidativo, que genera un aumento de los radicales libres y la peroxidación lipídica que conlleva a la destrucción de las células endoteliales. Por otra parte, (Tseng *et al.*, 2006), describen que el cloruro férrico atraviesa el endotelio a través de unas microvesículas que genera la denudación endotelial del vaso.

Registro de flujo durante la trombogénesis

Una vez colocada la sonda, se reparte alrededor del sensor un gel de ultrasonidos que permite la detección de flujo. Cuando la lectura se vuelve constante y estable, se considera a este valor como “flujo basal”. Posteriormente, se deposita sobre la superficie arterial el papel con FeCl_3 (tiempo = 0 min), que tras 1,5 min se retira y se lava la zona con suero salino, para hacer más reproducibles los datos. Durante los siguientes 30 min se recopilan datos de flujo de forma continua hasta generar un registro, ver [Figura 24](#).

Tras inducir un daño local en la pared del vaso comienza a generarse un trombo pegado a la pared, que va creciendo con el tiempo hasta que es lo suficientemente grande como para llegar a ocluir la luz del vaso, en este momento la sonda deja de detectar flujo. Si el valor cero se mantiene durante tres minutos consecutivos, se considera que el trombo ha cerrado de forma estable la luz de la carótida. A menudo, se forman trombos que no son lo suficientemente estables y son arrastrados por el torrente circulatorio, esto se detecta en el registro como un aumento repentino del flujo, ver [Figura 24](#).

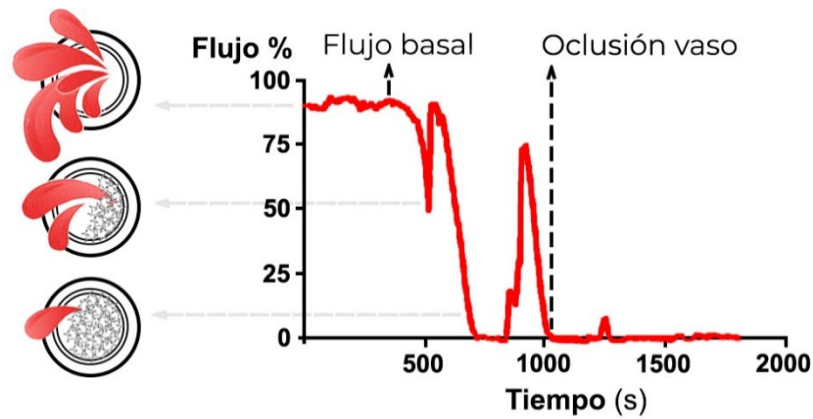


Figura 24. Ejemplo de gráfica de registro. Sobre la superficie de la carótida se pone un papel impregnado en FeCl_3 ($t = 0$ s). El flujo basal (Flujo = 100%) disminuye como consecuencia de la formación de un nuevo trombo, en ocasiones la luz del vaso se ocluye por completo (Flujo = 0%), pero durante un breve periodo de tiempo pues se arrastra el trombo. Finalmente, ocurre lo que se considera la oclusión del vaso real, donde el flujo cesa permanentemente.

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EX VIVO

4.1. CAPACIDAD VASOCONSTRICTORA DE ANILLOS DE AORTA

Para comprobar la capacidad de vasoconstricción refleja que tienen los vasos de ambos modelos, realizamos estudios de funcionalidad vasomotora en un vaso de origen arterial, lo suficientemente grande como para conseguir ver diferencias, la aorta.

Procedimiento

Se extirpa la aorta de los animales, que se limpia del tejido conectivo que la rodea. Posteriormente, se corta en secciones de 2 mm de longitud, generando así los anillos de aorta. Cada uno de estos anillos se conecta a un miógrafo de cuatro canales, el *Multiwire Myograph System*, introduciendo dos finos alambres por la luz del anillo. Uno de los alambres va conectado al transductor del aparato y el otro se une a un tornillo micrométrico que

permite controlar la tensión aplicada al vaso. A continuación, se sumergen los anillos en un baño que contiene solución de Krebs a 37 °C. Tras un período de estabilización de 30 minutos, se normalizan a una tensión y se ajusta la tensión del anillo a 5 mN y se procede a la realización de las pruebas de respuesta a distintos agentes vasoconstrictores.

4.1.1. Respuesta contráctil no dependiente de receptores

En primer lugar, se realiza en cada uno de los anillos un estudio de su capacidad contráctil como respuesta a una solución hiperpotásica [120 mM], esta medida se denomina parámetro KPSS (de sus siglas en inglés, High potassium Physiological Saline Solution o Solución de suero fisiológico con alto contenido en potasio). Este parámetro nos permite estudiar la capacidad de contracción no dependiente de receptores, puesto que esta se genera como consecuencia de una despolarización de la membrana, que cursa con la entrada masiva de iones Ca^{2+} y consiguiente contracción (Hussain *et al.*, 2017).

Una vez obtenido el parámetro KPSS, los datos que se generen en los experimentos de dosis respuesta se expresan en forma de porcentaje con respecto a este valor. De esta manera, al normalizar los datos se evita la variabilidad entre anillos.

4.1.2. Curvas concentración-respuesta a agentes vasoconstrictores

En estos experimentos, los anillos de aorta se someten a uno de los fármacos vasoconstrictores que se han elegido para este estudio, a saber, noradrenalina (NA), tromboxano A_2 (TXA_2) y serotonina (5-HT). La elección de estos agentes se describe en el apartado “Agentes vasoconstrictores”.

Se añade al baño concentraciones crecientes de noradrenalina [10^{-9} - 3×10^{-6} M], serotonina [10^{-8} - 3×10^{-5} M] y tromboxano (U46619) [10^{-9} - 10^{-6} M],

en cada caso. Antes de añadir la siguiente concentración, se espera el tiempo suficiente para obtener una respuesta de concentración estable. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra María José Montero Gómez y Rubén Aparicio Peñacoba, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Agentes vasoconstrictores

Tal y como se ha descrito en la parte de introducción de este trabajo, cuando se produce un daño en la pared vascular, una de las respuestas más rápidas y locales que se generan es el espasmo vascular local. Este efecto se desencadena en respuesta a la activación de los receptores del dolor, que activan el sistema nervioso, y la liberación de citoquinas con acción vasoconstrictora, como el tromboxano A₂, serotonina y epinefrina, secretado por las plaquetas activadas (Paredes and Chan, 2013). Todas estas moléculas son el origen de la contracción drástica del músculo liso vascular.

Por esta razón se han elegido tres de las moléculas vasoconstrictoras más importantes presentes en la hemostasia, la noradrenalina, la serotonina y el tromboxano A₂.

4.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ENDOTELIALES PROCEDENTES DE PULMÓN DE RATÓN (MLEC)

Algunos estudios que forman parte de este trabajo han requerido del uso de líneas celulares procedentes de los modelos de ratón de la enfermedad HHT. Se obtuvieron seis líneas celulares con distinto fondo genético aisladas de los seis modelos murinos descritos en esta tesis. Es decir, a partir de los ratones modelo de HHT1 (*Eng*^{+/-}) y sus controles (*Eng*^{+/+}), ratones modelo de HHT2 (*Alk1*^{+/-}) y sus controles *Alk1*^{+/-}, y, por último, a partir de ratones que sobreexpresan endogлина (*ENG*⁺) y sus controles, ratones C57B6/J.

4.1. Obtención de las líneas celulares de cultivo primario

Para generar cada una de las líneas de cultivo primario de células endoteliales procedentes de ratón (MLEC, por sus siglas en inglés *Mice Lung Endothelial Cells*) se utilizan los pulmones de 3 ratones de menos de 2 meses de edad y con el mismo fondo genético.

Se sacrifican a los animales mediante dislocación cervical y se extraen los pulmones que se sumergen en medio Ham's-F12 a 4 °C. Se extrae cada uno de los lóbulos pulmonares y se elimina con ayuda de unas pinzas y tijeras restos de coágulos o tejido conectivo. Posteriormente, se trituran los pedazos y se introducen en una solución de PBS con colagenasa tipo I [500 µg/ml] y ADNasa [0,002%]. Se mantiene la digestión a 37 °C durante 1 h en agitación y se termina de disgregar el tejido haciendo pasar toda la solución por una aguja de 19G. A continuación, se filtra toda la mezcla con un filtro *cell strainer*. La parte líquida decantada se centrifuga 5 min a 300 g y el pellet resultante se resuspende en medio Advanced DMEM/F12 20% FBS, suplementado con 50 U/ml de penicilina/estreptomicina, glutamina 2 mM, 30 µg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS, por sus siglas en inglés, *Endothelial Cell Growth Supplement*), 100 µg/ml de heparina bovina. La suspensión celular se siembra en placas pretratadas con una matriz compuesta de gelatina al 0,1%, fibronectina al 0,01% y colágeno al 0,01% que simula la matriz extracelular, permitiendo así que las células endoteliales puedan adherirse al fondo de la placa Petri.

4.2. Selección negativa. Retirada de eritrocitos y macrófagos

La suspensión de células que se obtiene después de todo el procedimiento descrito está compuesta de células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y eritrocitos. No obstante, para obtener un cultivo puro, han de eliminarse todas las células que no sean endoteliales. Para ello, tras 24 horas de incubación, se hace un cambio de medio para eliminar gran parte de los

eritrocitos. Y después de 48 horas, se realiza una primera selección en la que se retiran los macrófagos, donde se incuban las células con una solución de anti-CD16/CD32 [1:150] durante 1 hora a 4 °C. Se retiran y lavan con PBS los restos de anticuerpo y se incuban de nuevo las células con una solución de bolas magnéticas o *beads* magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario [1:60].

Finalmente, se elimina la adhesión de las células a la matriz del plástico con tripsina-EDTA [0,25%] y se transfieren las células a un tubo cónico de 15 ml de capacidad que se coloca dentro de un soporte imán (DynamagTM-15, Thermo Fisher Scientific). El campo magnético atraerá las *beads* que en su mayoría se han unido a la superficie de los macrófagos. Tras unos minutos, se recoge la suspensión celular libre de macrófagos.

4.3. Selección positiva. Aislamiento de células endoteliales

A pesar de haber retirado los macrófagos, aun no se ha obtenido un cultivo puro de células endoteliales. Por esta razón se realiza una segunda selección donde se separan específicamente las células endoteliales. Después de 48 horas de la primera selección, similar a la anterior selección, se incuban las células con un anticuerpo anti-CD102 [1:300] durante una hora, se retira el exceso, se lava con PBS y se incuban con las *beads* magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario. De nuevo, tras las incubaciones, se resuspenden las células con tripsina-EDTA al 0,25%, la suspensión de células se introduce en un tubo de 15 ml de capacidad que se acopla al soporte magnético. En esta ocasión, las células endoteliales que hayan sido reconocidas por las *beads* magnéticas, se verán atraídas por el imán. Se retira y desecha el sobrenadante y las células adheridas a la pared del tubo se resuspenden en medio de cultivo Advanced DMEM suplementado. Finalmente, se siembra el cultivo puro de células endoteliales y se expandirá hasta alcanzar la cantidad necesaria para realizar los experimentos.

Anticuerpos utilizados en las selecciones para la obtención de la línea celular MLEC

Los anticuerpos primarios utilizados para la selección de los distintos tipos celulares fueron los siguientes. Para la selección y retirada de macrófagos, principalmente, se utiliza un anticuerpo que reconoce dos *clusters* de diferenciación, CD32 presente en los linfocitos B y CD16 presente en la superficie celular de las células NK (por sus siglas en inglés *natural killer*), también en neutrófilos polimorfonucleados, leucocitos, monocitos y macrófagos. En definitiva, se engloba la gran mayoría de las células del sistema inmune, que comparten marcadores con las células endoteliales y dificultarían la selección positiva (Janeway, 2001).

En la segunda selección, se utiliza un anticuerpo que reconoce el *cluster* de diferenciación CD102 expresado en linfocitos T y B, células endoteliales, eritrocitos, macrófagos, monocitos y plaquetas. El hecho de que CD102 se comparta con otras líneas de células que podrían estar presentes en el tejido pulmonar del que obtenemos el cultivo, hace muy necesaria una primera selección que elimine todas células que puedan interferir en la pureza de la línea MLEC.

4.4. Mantenimientos de líneas celulares MLEC

Las MLEC tienen una morfología y una tendencia de crecimiento en colonias típica de estas células endoteliales, ver [Figura 25](#).

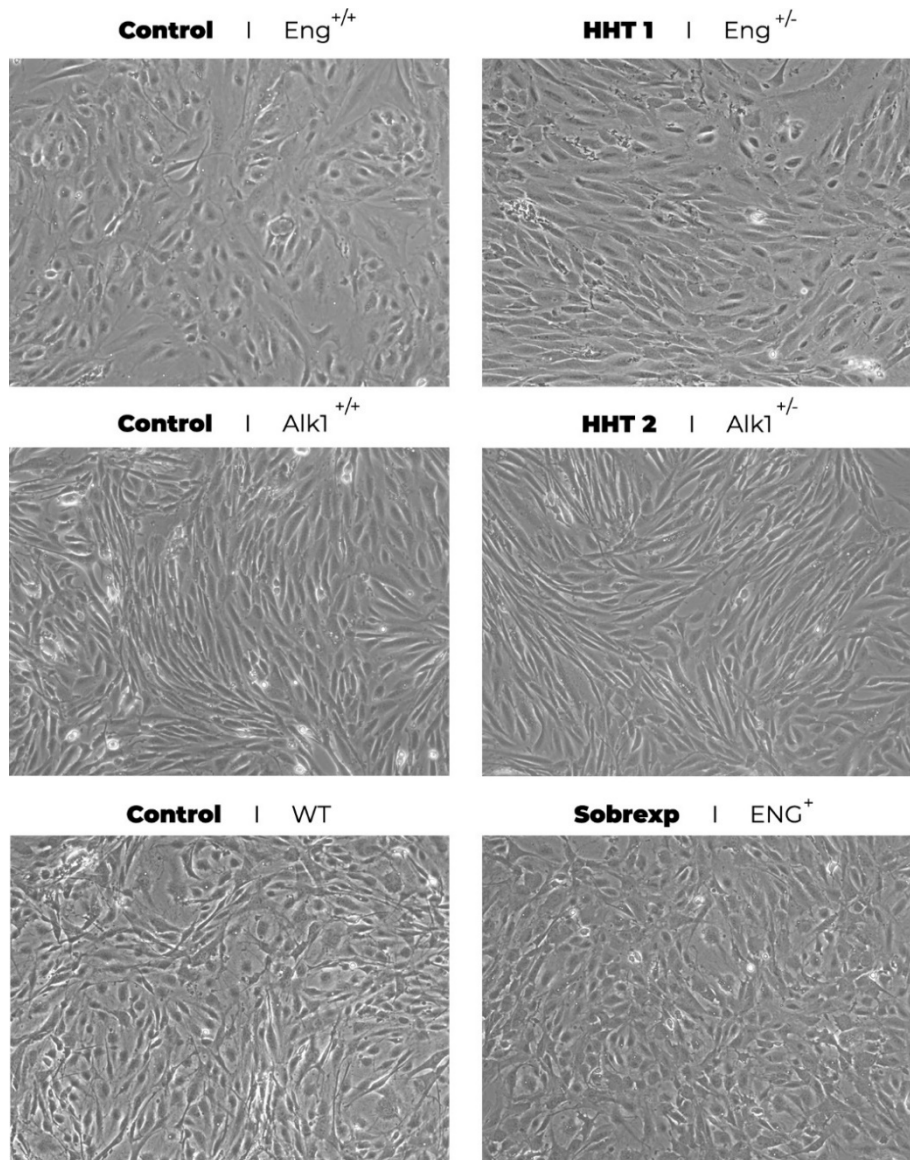


Figura 25. Análisis microscópico de una monocapa de células MLEC confluentes. Se representan células MLEC de cada uno de los genotipos utilizados en los procedimientos experimentales: Células MLEC *Eng*^{+/+} controles de las células *Eng*^{+/-} (A y B); células MLEC *Alk1*^{+/+} controles de las células *Alk1*^{+/-} (C y D) y línea celular de MLEC WT controles de las células *ENG*⁺ (E y F).

El crecimiento de estas células no es rápido por lo que típicamente se siembran en placas de 60 mm pretratadas previamente con una matriz que simula la matriz extracelular, permitiendo así que las células endoteliales puedan adherirse al fondo de la placa. Una vez alcanzada la confluencia, se realizan pases 1:2 hasta un máximo de 6 pases, ya que, tras 6 - 7 pases, las MLEC comienzan a perder algunas de sus características. Para la realización de este trabajo se han utilizado MLEC que se encontraban en pases de 3 a 6.

5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES REALIZADOS IN VITRO

5.1. FUNCIÓN PLAQUETARIA, CAPACIDAD DE ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN

El análisis plaquetario mediante citometría de flujo se utiliza con frecuencia en investigación para evaluar la función de las plaquetas (Shattil, Cunningham and Hoxie, 1987; van Asten, Schutgens and Urbanus, 2018).

En este trabajo se realizaron experimentos *in vitro* con plaquetas procedentes de sangre de ratón para comprobar la capacidad de activación y de agregación de estas. Las muestras de sangre se obtuvieron según lo descrito en el apartado de “Extracción de sangre del plexo retroorbital”.

5.1.1. Ensayo de activación plaquetaria

La muestra de sangre, 50 - 75 μl , se diluye en 1 ml de tampón Tyrode's y se añade CaCl_2 [8 mM]. Posteriormente, se añaden los tres marcadores, anti-CD62P-FITC, CD41/CD61-PE y anti-CD41-APC [25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,5 μl en 30 μl y 6,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$] y el agonista iniciador de la activación de las plaquetas, la trombina [1 U/ml]. Tras 15 min de incubación, se añaden 400 μl de PBS para parar la reacción. Finalmente, las muestras se analizan por citometría de flujo, utilizando el citómetro BD AccuriTM C6. Este análisis se detalla en el apartado específico de “anticuerpos utilizados para el análisis mediante citometría de flujo”.

5.1.2. Agregación plaquetaria

Tras obtener la muestra de sangre diluida en tampón Tyrode's, esta se divide en dos alícuotas, a una de ellas se le añade anti-CD9-PE y a la otra, anti-CD9-FITC [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. Se incuba y se hace un lavado con Tyrode's,

centrifugando 5 min a 2250 g. Posteriormente, se juntan las dos alícuotas de sangre marcada y se añade CaCl_2 [1,66 mM]. Finalmente se divide la muestra con las dos poblaciones marcadas en 5 alícuotas y a cuatro de ellas se les añade un activador plaquetario activador plaquetario, trombina [1 U/ml]. Se para la reacción tras 1 min, 2 min, 5 min y 10 min, añadiendo 540 μl de p-formaldehído al 0,5% de concentración. Finalmente, la muestra se analiza por citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri™ C6, este análisis se detalla en el siguiente apartado.

Anticuerpos utilizados para el análisis mediante citometría de flujo

Para analizar la funcionalidad de las plaquetas mediante citometría de flujo se utilizan distintos anticuerpos que permiten distinguir las diferentes poblaciones de interés.

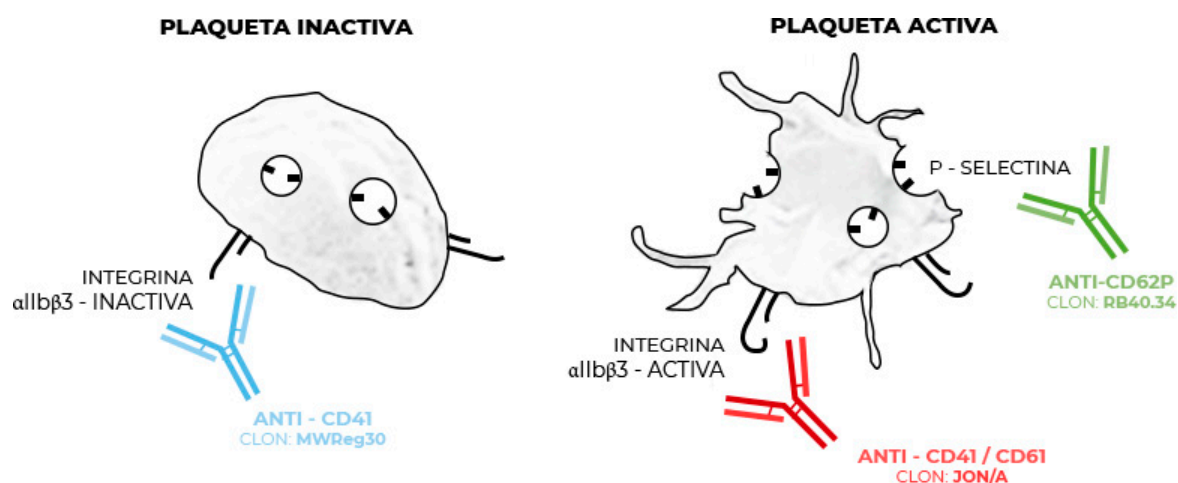


Figura 26. Antígenos plaquetarios reconocidos por los anticuerpos utilizados en los ensayos in vitro de activación. Adaptado de (van Asten, Schutgens and Urbanus, 2018).

Los ensayos de activación plaquetaria utilizan anticuerpos que reconocen la forma activada de CD41/CD61 también conocido como la glicoproteína IIb/IIIa o receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, muy expresado en la superficie de las plaquetas y megacariocitos. Y tal y como se describe con más detalle en la parte de introducción, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ está implicado en la activación y agregación de las plaquetas. Por otra parte, CD62P se expresa en plaquetas

activas, megacariocitos y células endoteliales. La principal función de CD62P es la de adhesión celular, ver [Figura 26](#) y [Figura 27](#).

De esta manera, los anticuerpos nos permiten aislar por citometría de flujo, la población formada exclusivamente por plaquetas, y dentro de esta el porcentaje de población de plaquetas activas e inactivas. Este análisis se representa en la [Figura 27](#).

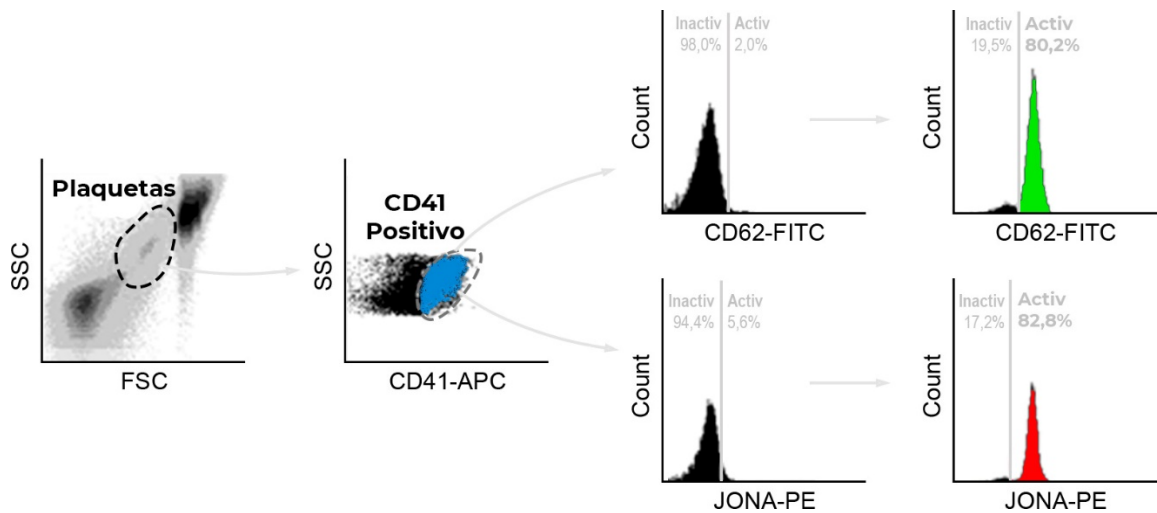


Figura 27. Análisis de las poblaciones de plaquetas obtenidas por citometría de flujo. Se preselecciona una población que corresponde a las plaquetas por tamaño y complejidad. En esta población se selecciona únicamente las que son CD41 positivas. A continuación, se añade un agonista para realizar el estudio de activación, aquella población que sea CD62 y/o JONA positiva, corresponderá a las plaquetas activadas.

En relación con los anticuerpos utilizados en agregación, estos reconocen CD9, que es una glicoproteína de membrana, muy expresada en la mayoría de las células del sistema inmune y, en concreto, altamente expresada en las plaquetas (Seehafer *et al.*, 1988). En este procedimiento de agregación, a diferencia del de activación, no se discriminan las poblaciones por el marcaje de distintos *cluster* de diferenciación, sino que se divide y se marca la sangre en dos poblaciones con dos colores distintos. De tal manera que, posteriormente, se unen las dos poblaciones y se activa. Así en el análisis citométrico podremos distinguir tres poblaciones, una marcada en verde, otra en rojo y finalmente una población con mezcla de ambos parámetros.

Cuanto más grande sea esta población más habrán agregado las plaquetas, ver [Figura 28](#).

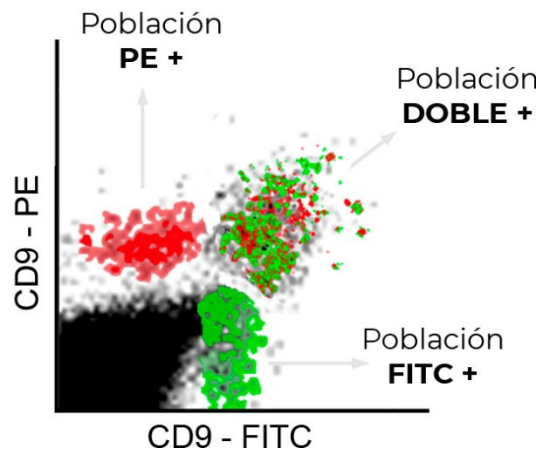


Figura 28. Análisis de las poblaciones de agregados plaquetarios mediante citometría de flujo. Las poblaciones de plaquetas positivas únicamente para CD9-PE o CD9-FITC, son plaquetas no agregadas. Sin embargo, la formación de agregados entre ambos grupos genera una población doblemente positiva.

5.2. ADHESIÓN DE PLAQUETAS A CÉLULAS ENDOTELIALES

Con objeto de estudiar si existe alguna interacción física entre las células endoteliales y las plaquetas, se diseñaron los siguientes experimentos de acuerdo a las técnicas utilizadas en trabajos previos, en colaboración con la Dra Elisa Rossi en la Universidad Paris Descartes, Francia.

Para ello, obtenemos una muestra de sangre de ratones WT, de acuerdo a lo descrito en el apartado “extracción de sangre a través del corazón”, utilizando citrato como anticoagulante. Se obtiene el plasma rico en plaquetas (PRP) y se resuspende hasta 1 ml de *washing buffer* con PGE1 [2×10^{-7} M] y ADP scavenger apyrase [1 U/ml]. Se realizan varios lavados mediante centrifugaciones hasta que finalmente se resuspende en *Walsh's buffer*. Gracias al hemocitómetro (ADVIA™ 120 hematology, Bayer) medimos la concentración de plaquetas de nuestra muestra, y ajustamos el valor hasta obtener una concentración de 4×10^4 plaquetas/ μ l.

5.2.1. Experimento estático de adhesión de plaquetas

Sobre una monocapa de células endoteliales MLEC procedentes de los modelos de ratón descritos en el apartado de “cultivo primario de células endoteliales procedentes de pulmón de ratón”, se añade la suspensión de plaquetas teñidas con calceína verde. Posteriormente, se añade CXCL12 [200 ng/ml], una quimiocina inflamatoria que activa las células endoteliales y las plaquetas, y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Tras este tiempo, se elimina el exceso de plaquetas que no hayan quedado adheridas a la monocapa de células endoteliales mediante varios lavados con PBS. Finalmente, el resultado se observa por microscopía de fluorescencia y se analiza el número de plaquetas adheridas por el programa ImageJ.

5.2.2. Experimento dinámico de adhesión de plaquetas

De manera muy similar a lo descrito en el apartado del experimento estático de adhesión de plaquetas, este procedimiento sigue los mismos pasos, con la diferencia de que tras la incubación de 30 min se somete a las células a un flujo de 0,4 ml/min durante 2 minutos, que simula el torrente sanguíneo. Para que esto sea posible, la monocapa de células endoteliales se genera dentro de una cámara de flujo y se analiza el número de plaquetas que han permanecido adheridas a las células endoteliales mediante un microscopio de fluorescencia (Observer D1, Zeiss) conectado a una cámara CCD (QIclick FCLR-12, Qimaging, Roper Scientific).

6. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PROTEÍNAS

TÉCNICA DE ELISA

El ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) es una técnica basada en la detección de un antígeno específico presente en la muestra mediante el uso de anticuerpos que finalmente, generan una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall and Perlmann, 1971).

Las muestras se adquirieron según lo descrito en el apartado “Trombogénesis sistémica aguda inducida por colágeno y epinefrina” y en “Estudio de los componentes principales de la fibrinólisis”. La elección de los tiempos de adquisición de las muestras de plasma se realizó teniendo en cuenta la semivida de la proteína y el grado de relevancia de esta al principio o al final del proceso. Así, se estudió los niveles de plasminógeno en las muestras recogidas a los 30 min, t-PA y PAI-1 en las muestras tomadas a las 8 h y, por último, uno de los productos de degradación de la fibrinólisis más importante, el dímero D que se estudió en las muestras recogidas a las 24 h del *bolus IV*. Además, se estudió el valor basal cada una de las proteínas a partir de las muestras recogidas antes de la inyección de colágeno y epinefrina.

Tabla 5. Kits comerciales de ELISA utilizados en este trabajo

KIT ELISA	NOMBRE DEL PRODUCTO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
PAI-1	RayBio® Mouse PAI-1 ELISA Kit	RayBiotech	ELM-PAII-1
Plasminógeno	Mouse Plasminogen (PLG) ELISA kit	Cusabio	CSB-EL018188MO-96T
t-PA	Mouse tPA (Tissue-type Plasminogen Activator) ELISA Kit	Elabscience	E-EL-M0917-96T
Dímero D	Mouse D-Dimer, D2D ELISA Kit	Cusabio	CSB-E13584m-96T

7. TRATAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron obtenidos según lo descrito anteriormente en cada uno de los apartados de procedimientos experimentales. En todos los experimentos *in vivo*, se recogieron datos de, al menos, 8 ratones por grupo; a excepción de los experimentos de estudio de los principales componentes de la fibrinólisis, donde el tamaño de la población es de 5 individuos por grupo. En cuanto a los experimentos *in vitro*, la población de estudio alcanza los 10-15 datos por grupo.

Cabe destacar que en todo el trabajo existen dos poblaciones principales de estudio, los datos procedentes del modelo murino HHT1 y el modelo HHT2, cada uno de ellos siempre comparado su respectivo grupo control, *Eng^{+/+}* y *Alk1^{+/+}*. Además, existe un tercer grupo, de sobreexpresión de endoglina (*ENG⁺*) y su grupo control formado por datos procedentes de ratones WT.

La preparación de los datos para su análisis estadístico fue rigurosa. Se realizó una descriptiva de los datos y de acuerdo con sus características se organizaron en bases de datos que recogen todas las variables correspondientes a cada individuo. Dichas bases de datos se diseñaron con el programa informático *Microsoft Excel Office 365*.

Para el análisis estadístico se estudió si la variable o variables a estudiar se distribuían de forma normal, es decir, si la distribución de los datos se ajusta a la campana de Gauss o, por el contrario, seguían una distribución no paramétrica. En general, los test realizados en este trabajo comparan la desviación estándar de la media de dos grupos de datos por lo que se ha aplicado el test estadístico t de Student, para los casos en los que se sigue una distribución normal, y el test U de Mann Whitney, para los casos en los que no se ajustan a la campana de Gauss.

Finalmente, en los estudios en los que se analizan varias variables, comparando siempre una población de estudio con su control, se aplicó los análisis de varianza ANOVA de una vía.

En todos los casos cuando la *p* valor es menor que 0,05 ($p < 0,05$) consideramos que hay diferencias significativas. Sin embargo, consideramos distintos niveles de significación, si la $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

Los análisis estadísticos y la generación de gráficas se realizaron con ayuda de los programas informáticos *IBM SPSS Statistics 25* y *GraphPad Prism 5*.

8. INFORMACIÓN DE ANTICUERPOS, REACTIVOS, SOLUCIONES, MATERIAL, EQUIPO Y SOFTWARE

ANTICUERPOS

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en este trabajo

Antígeno reconocido	Marcador	Especie reconocida	Hospedador	Casa comercial	Referencia
Anti-CD9 <i>Clon: MZ3</i>	FITC Concentración: [0,5 mg/ml]	Ratón	Rata	BioLegend	124808
Anti-CD9 <i>Clon: MZ3</i>	PE Concentración: [0,5 mg/ml]	Ratón	Rata	BioLegend	124806
Anti-CD16/CD32 <i>Clon: 2.4G2</i>	No Concentración: [0,5 mg/ml]	Ratón	Rata	BD Pharmigen	553141
Anti-CD41 <i>Clon: MWReg30</i>	APC Concentración: [0,2 mg/ml]	Ratón	Rata	eBioscience	17-0411-82
Anti-CD41/CD61 <i>Integrin αIIbβ</i> <i>Clon: JON/A</i>	PE Concentración: [1,5 ml]	Ratón	Rata	Emfret Analytics	M023-2
Anti-CD62P <i>Clon: RB40.34</i>	FITC Concentración: [0,5 mg/ml]	Ratón	Rata	BD Biosciences	561923
Anti-CD102 <i>Clon: 3C4(mIC2/4)</i>	No Concentración: [0,5 mg/ml]	Ratón	Rata	BD Pharmingen	553326
Dynabeads	Dynabeads®	Rata	Oveja	Thermo Scientific	110.35

REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos y productos se recogen en la [Tabla 7](#) mostrada a continuación:

Tabla 7. **Reactivos y productos utilizados en este trabajo**

REACTIVO/PRODUCTO (Referido en el texto)	NOMBRE ORIGINAL DEL PRODUCTO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Ácido Cítrico / citrato sódico	Citric Acid	Sigma-Aldrich	C7254
Advanced DMEM	Advanced DMEM/F-12	Gibco	12634010
Apirasa secuestrador de ADP	Apyrase from potatoes Adenosine 5'-diphosphatase	Sigma-Aldrich	A6410
BSA	Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich	A7906
Buprenorfina	Buprex 0,3 mg	Reckitt Benckiser	961425
CaCl ₂	Cloruro de Calcio	Sigma-Aldrich	C7902
Calceína verde	CellTrace™ Calcein Green, AM	Thermo Fisher	C34852
Colagenasa	Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	C7926
Colágeno	Collagen	Chrono-Par	385
Colágeno (matriz)	Collagen I, Bovine	Corning	354231
CXCL12	CXCL12	R&D	350-NS-010
Dextrose	D(+)-Glucose	Panreac	121341
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich	34869
ECGS	Endothelial cell growth supplement from bovine hypothalamus	Generon	GEN-ECGS-50
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	Sigma-Aldrich	E5134
Epinefrina	Epinephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich	E4642
Espermidina	Spermidine	Sigma-Aldrich	S1141
Etanol	Etanol 96% v/v para diagnóstico clínico	Panreac	2.510.851.212
FBS	Fetal Bovine Serum		10270106
FeCl ₃	Ferric chloride	Sigma-Aldrich	157740

Fibronectina	Fibronectin, from bovine plasma	Sigma-Aldrich	F1141
Formaldehido 3,5-4%	Formaldehido 3,5-4% tamponado	Panreac	252931.1315
Gelatina	Gelatin from bovine skin	Sigma-Aldrich	G9391
Glucosa	Glucosa	Panreac	121341
Glutamina	L-Glutamine	Gibco	25030081
Heparina (solución inyectable)	Heparina 1% (5 000 UI)	Hospira	654754.0
Heparina	Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa	Sigma-Aldrich	H4784
HEPES	HEPES	Sigma-Aldrich	H4034
Isoflurano	Vetflursane	Virbac	57837-4
Isopropanol	Isopropanol (2-propanol)	Merck	109634
KCl	Cloruro potásico Potassium chloride	Prolabo	26759.291
KH₂PO₄ - Fosfato de potasio monobásico	Monopotassium phosphate	Sigma-Aldrich	P5379
MgCl₂ Cloruro de magnesio	Magnesium chloride	Sigma-Aldrich	M8266
MgSO₄ Sulfato de magnesio	Magnesium sulfate	Probus	121310
NaCl Cloruro Sódico	Sodium chloride	Sigma-Aldrich	S3014
NaH₂PO₄ Bifosfato de sodio	Sodium phosphate dibasic	Sigma-Aldrich	S5136
NaHCO₃ Bicarbonato de sodio	Sodium hydrogen carbonate	Panreac	141638
Noradrenalina	Norepinephrine	Sigma-Aldrich	A0937
Penicilina Estreptomina	Penicilina-estreptomina (10.000 U/ml)	Gibco	11548876
PIPES	Piperazinediethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich	P6757
Povidona iodada	Betadine	Pharma SAU	997437
Prostaglandina E1 PGE₁	Prostaglandin E1	Sigma-Aldrich	P5515
Proteinasa K	Proteinase K	Roche	03115879001
Tripsina 0,25%	Trypsin-EDTA (0.25%), Phenol red	Gibco	25300
TRIS-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride	Sigma-Aldrich	T5941
Trombina	Thrombin from bovine plasma	Sigma-Aldrich	T7513

SOLUCIONES ESPECÍFICAS

En este trabajo se utilizan soluciones de trabajo específicas que se detallan a continuación:

Tabla 8. **Soluciones utilizadas**

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
PBS	NaCl 138 mM; Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM; KCl 3 mM; KH ₂ PO ₄ 1,5 mM; H ₂ O miliQ csp. pH = 7,4
Suero fisiológico / suero salino	NaCl 0,9%. pH = 7,4
Solución Krebs	NaCl 118 mM; KCl,4,7 mM; CaCl ₂ 2,5 mM; KH ₂ PO ₄ 1,2 mM; MgSO ₄ 1,2 mM; NaHCO ₃ 25 mM y glucosa 11 mM. pH = 7,4.
Tampón de lisis para PCR	Tris 50 mM; EDTA 5 mM; NaCl 100 mM; DTT 1mM; espermidina 0.5 mM; proteinasa K 250 ng/μL
Tampón Tyrode's	NaCl 134 mM; HEPES 20 mM; NaHCO ₃ 12 mM; Glucosa 5 mM; KCl 2,9 mM; MgCl ₂ 1 mM; Na ₂ HPO ₄ 0,34 mM; H ₂ O miliQ csp. pH = 7,4
Tampón de lavado para PRP	NaCl 103 mM; Ácido cítrico 36 mM; KCl 5 mM; Glucosa 5 mM; CaCl ₂ 2 mM; MgCl ₂ 1 mM; H ₂ O miliQ csp. pH = 7,4
Tampón Walsh's	NaCl 137 mM; PIPES 20 mM; Dextrose 5,6 mM; NaH ₂ PO ₄ 3,3 mM; KCl 2,7 mM; BSA 1 g/L; MgCl ₂ 1 mM; H ₂ O miliQ csp. pH = 7,4
TBS	137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; H ₂ O miliQ csp. pH = 7,3

MATERIAL

Los detalles del material utilizado en este trabajo de tesis se recogen en la Tabla 9:

Tabla 9. **Material utilizado**

MATERIAL	NOMBRE ORIGINAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Aguja 19 G	Aguja STERICAN 19 G	Braun	4657799
Agujas 23 G	Aguja STERICAN 23 G	Braun	4657667
Agujas 30 G	Aguja STERICAN 30 G	Braun	4656300
Capilar Heparinizado	<i>Haematocrit capillaries</i>	Deltalab	7301
Criovial	<i>Cryogenic vial</i>	Thermo Scientific	5000-0020
Filtro embudo 70 μm	<i>Cell Strainer 70 μm</i>	Corning	352350
Filtro jeringa de 0,2 μm	<i>Syringe driven Filter</i>	Millipore	SLGP033RB
Gel para ultrasonidos	<i>Gel-Quick Eco Gel[®]</i>	Lessa	99.800.20
Hilo de sutura	Sutura sintética de ác. Poliglicólico trenzado 5/0	Aragó	38115
Hoja de bisturí	Hojas bisturí	Krape	BS EN 27740
Jeringa 1 ml	Jeringa OMNIFIX 1ml	Braun	B9161406V
Jeringa 20 ml	Jeringa OMNIFIX 20 ml	Braun	B4616200V
Placa 35 mm	35 mm <i>treated Cell Culture Dish</i>	Corning	353001
Placa 60 mm	60 mm <i>treated Cell Culture Dish</i>	Corning	353004
Placa 100 mm	100 mm <i>treated Cell Culture Dish</i>	Corning	353003
Placas de 96 pocillos para qPCR	<i>Hard-Shell[®] 96-Well PCR Plates</i>	Bio-Rad	HSS9601
Portaobjetos 8 pocillos	Portaobjetos Millicell™ EZ 8 pocillos	Merk Milipore	11765254
Rascador de células	<i>Falcon[®] Cell Scraper with 25cm Handle 1.8cm Blade</i>	Corning	353086
Tubo para cánula de PESO	<i>Polyethylene tubing</i>	BD Intramedic	427410
Tubo EDTA	<i>Capillary Blood Collection Tube</i>	Terumo Medical Corporation	T-MQK

EQUIPO Y SOFTWARE

Tabla 10. **Equipo utilizado en este trabajo**

EQUIPO / APARATO	CASA COMERCIAL	MODELO
Campana de flujo laminar vertical	Flow Laboratories	Gelaire TC-48
Citómetro BD Accuri™	BD Bioscience	C6 Plus
Espectrofotómetro	Epoch	BioTek
Hemocitómetro	Bayer	ADVIA™ 120 hematology
Imán para tubos de 15mL	Thermo Fisher Scientific	Dynamag™-15
Máquina de anestesia inhalatoria	-	MSS Isoflurane
Máquina de rasurar	Oster	Golden A5
Miógrafo <i>Multiwire Myograph System</i>	DMT	Modelo 610M
Módulo de medición de flujo <i>Perivascular Flow Module</i>	Transonic Systems Inc.	TS420
NanoDrop®	Thermo Fisher Scientific	ND-1000
pH metro	Crison	Basic 20
PowerLab	AdInstruments	2/25
Termociclador	Bio-Rad	MyCycler™
Termociclador qPCR	Bio-Rad	iQ™5
Transiluminador	Bio-Rad	GelDoc
Sonda flujometro <i>Transonic® Flowprobe</i>	Transonic Systems Inc.	MA0.5PSB

Tabla 11. **Software utilizado**

PROGRAMA INFORMÁTICO	COMPAÑÍA
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Incorporated
Gen5	BioTek
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.
iQ TM 5 Optical System Software	Bio-Rad
Living Image [®] 3.2	Caliper Life Sciences
Quantity One	Bio-Rad
Hemocitómetro	ADVIA TM 120
Nanodrop 2000	ThermoScientific
Sonda flujometro	Chart5
Accuri	BD
Infinicyt TM 2.0	Cytognos

The background is a detailed technical drawing in a light grey or white color on a white background. It features various mechanical components, including gears of different sizes, shafts, and rectangular blocks. Some parts are hatched with diagonal lines to indicate shading. There are numerous dimension lines with arrows and numerical values such as '22.244', '26', '41.5', and '22'. The overall style is that of a hand-drawn or computer-generated engineering blueprint.

RESULTADOS

“Change is inevitable, progress is optional”

Adam Ondra

1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MODELOS DE RATÓN A UNA HEMORRAGIA

Para estudiar el sistema de hemostasia en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria disponemos de dos modelos de murinos. En primer lugar, un ratón heterocigótico para el gen de endogлина ($Eng^{+/-}$), y, por otra parte, un ratón heterocigótico para el gen de Alk1 ($Alk1^{+/-}$), ver [Figura 29](#). Estos ratones simulan genéticamente los dos grupos mayoritarios de la HHT, subgrupo HHT1 y HHT2, respectivamente. Los grupos control de este estudio están formados por ratones *wild type* procedentes de la misma camada.

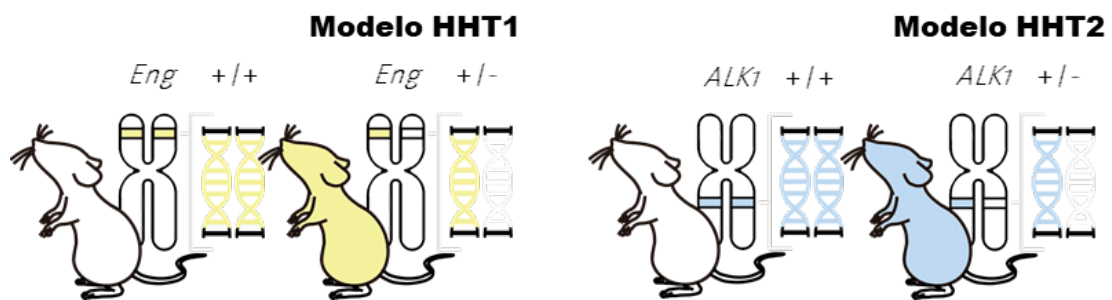


Figura 29. Ratones modelo de HHT1, HHT2 y sus respectivos grupos control. Animales haploinsuficientes para el gen Eng ($Eng^{+/-}$) y $Alk1$ ($Alk1^{+/-}$), respectivamente.

En primer lugar, realizamos en estos animales el procedimiento experimental de tiempo de sangrado (Saito *et al.*, 2016), donde generamos una hemorragia reproducible y controlada, mediante un pequeño corte del extremo terminal de la cola de los ratones.

En los resultados obtenidos en este experimento se puede observar que ambos modelos tienen un tiempo total de sangrado significativamente superior al de sus grupos control ([Figura 30](#)).

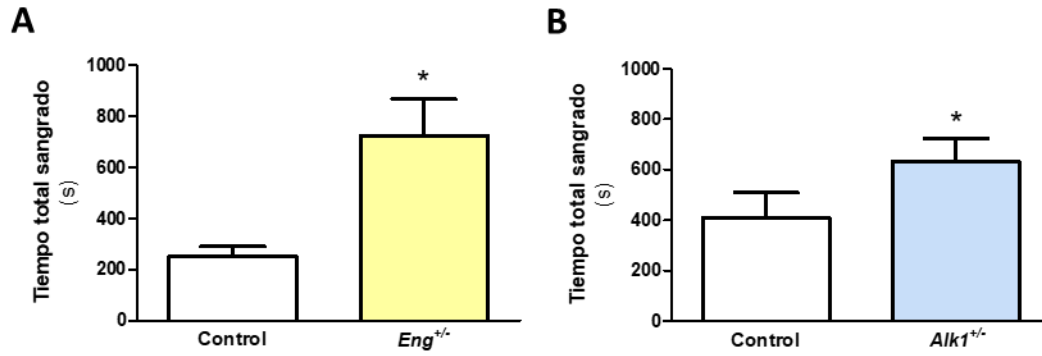


Figura 30. Tiempo total de sangrado. Análisis de la suma de periodos en los que la hemorragia está activa o tiempo total de sangrado de los ratones *Eng*^{+/-} (A) y *Alk1*^{+/-} (B). Se representan las medias \pm EEM, test estadístico U de Mann Whitney. Control *Eng*^{+/+} (n = 15); *Eng*^{+/-} (n = 14); Control *Alk1*^{+/+} (n = 20); *Alk1*^{+/-} (n = 20). (*) p < 0,05.

Si se analizan individualmente los dos componentes que conforman este parámetro, duración del primer sangrado y tiempo de resangrado, observamos que en ninguno de los dos modelos existen diferencias significativas en el primer sangrado (Figura 31A-B). Sin embargo, los tiempos de resangrado de ambos grupos de ratones haploinsuficientes son significativamente más prolongados que los de sus respectivos grupos control (Figura 31C-D).

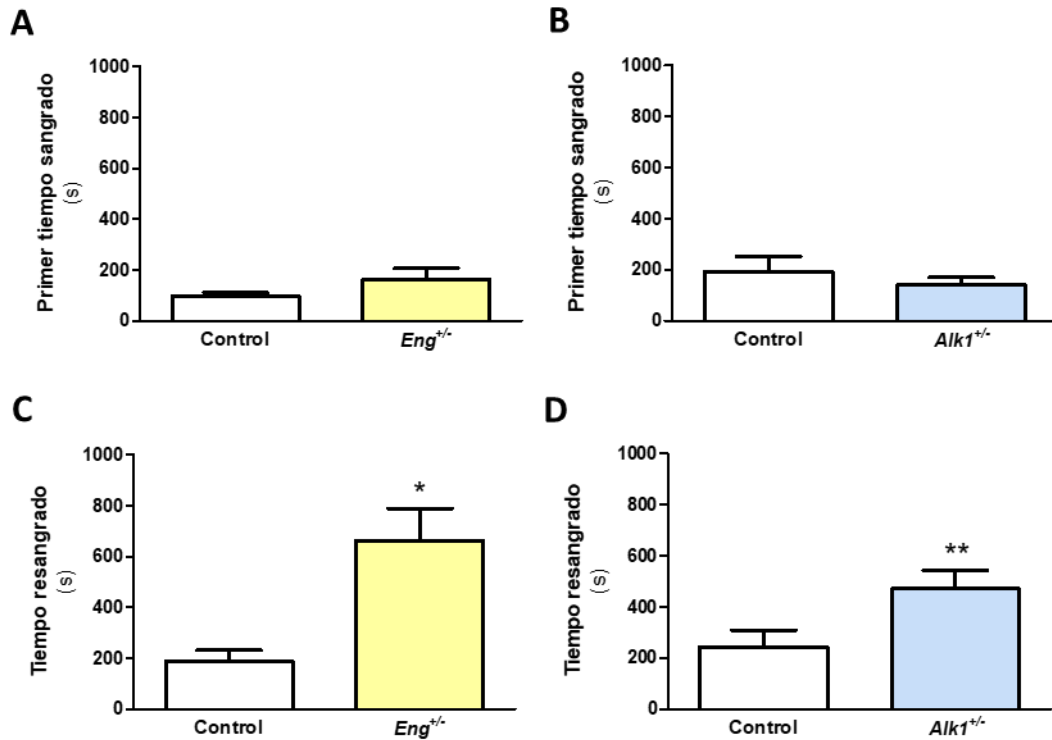


Figura 31. Patrón de sangrado de los ratones *Eng*^{+/-} y *Alk1*^{+/-}. (A y B) Cuantificación del tiempo que sangran desde que se genera la hemorragia hasta la primera detención del sangrado o primer tiempo de sangrado. (C y D). Análisis de la suma del resto de tiempos donde la hemorragia es activa o tiempo de resangrado. Se muestran las medias \pm EEM, test estadístico U de Mann Whitney. Control *Eng*^{+/+} (n = 15); *Eng*^{+/-} (n = 14); Control *Alk1*^{+/+} (n = 20); *Alk1*^{+/-} (n = 20). (*) p < 0,05; (**) p < 0,01.

Dentro de este parámetro de tiempo de resangrado, estudiamos la duración de los mismos y observamos que había un porcentaje significativamente mayor de ratones haploinsuficientes que tienen un sangrado con una duración superior a dos minutos (Figura 32). Este hecho se ha observado en ambos ratones modelo, por lo que la deficiencia de endogлина o de *Alk1* afecta a la hemostasia de los ratones. Por lo tanto, ambos modelos animales de HHT parecen tener más dificultades que sus grupos control para detener una hemorragia.

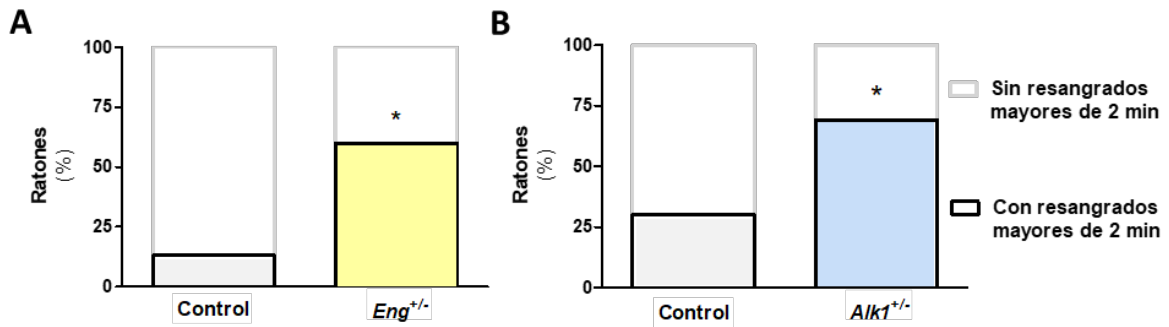


Figura 32. Ratones que tienen resangrados que duran más de 2 minutos. Cuantificación del número de ratones que tienen resangrados mayores de 2 minutos. Ambos gráficos son la representación de tablas de contingencia mostradas en porcentaje, en negro se representan los ratones que han tenido al menos un sangrado más prolongado de dos minutos, en marco gris, se representan el resto de los ratones, los que no han tenido ningún resangrado mayor de dos minutos. Test estadístico Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. (*) $p < 0,05$.

2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HEMOSTASIA

El sistema de hemostasia es un proceso muy complejo que comprende una amplia variedad de componentes celulares y moleculares que interactúan entre sí simultáneamente (Sira, 2016). Por ello, y para poder estudiar de manera más exhaustiva cada uno de estos componentes, hemos dividido este proceso en las fases descritas en el apartado de introducción para su mejor comprensión y estudio.

También decidimos analizar los modelos haploinsuficientes para *Eng* y *Alk1* por separado. Hacer esta distinción nos facilitará el estudio de las posibles causas que llevan a la aparición de este fenotipo a partir de un origen genético distinto, y su posterior análisis conjunto por su relación molecular en la ruta de señalización de la superfamilia de TGF- β .

Así, en primer lugar, estudiamos los diferentes componentes de la hemostasia en los ratones haploinsuficientes para el gen de endoglina (*Eng*^{+/-}), modelo experimental del subgrupo HHT1 de la enfermedad.

2.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA RESPUESTA VASOCONSTRICTORA ARTERIAL

Tal y como se ha descrito en el apartado de introducción, cuando se produce un daño en la pared vascular, una de las respuestas más rápidas que ocurren es una vasoconstricción local refleja consecuencia de la activación del sistema nervioso por los receptores del dolor y la liberación de citoquinas con acción vasoconstrictora, como la epinefrina, el tromboxano A₂ o la serotonina (Paredes and Chan, 2013). Por esta razón, se desarrollaron experimentos *ex vivo* con anillos de aorta procedentes de ratones deficientes en *Eng* y sus respectivos controles, donde estudiamos la capacidad de respuesta que tienen ante diferentes agentes vasoconstrictores, ver Figura 33.

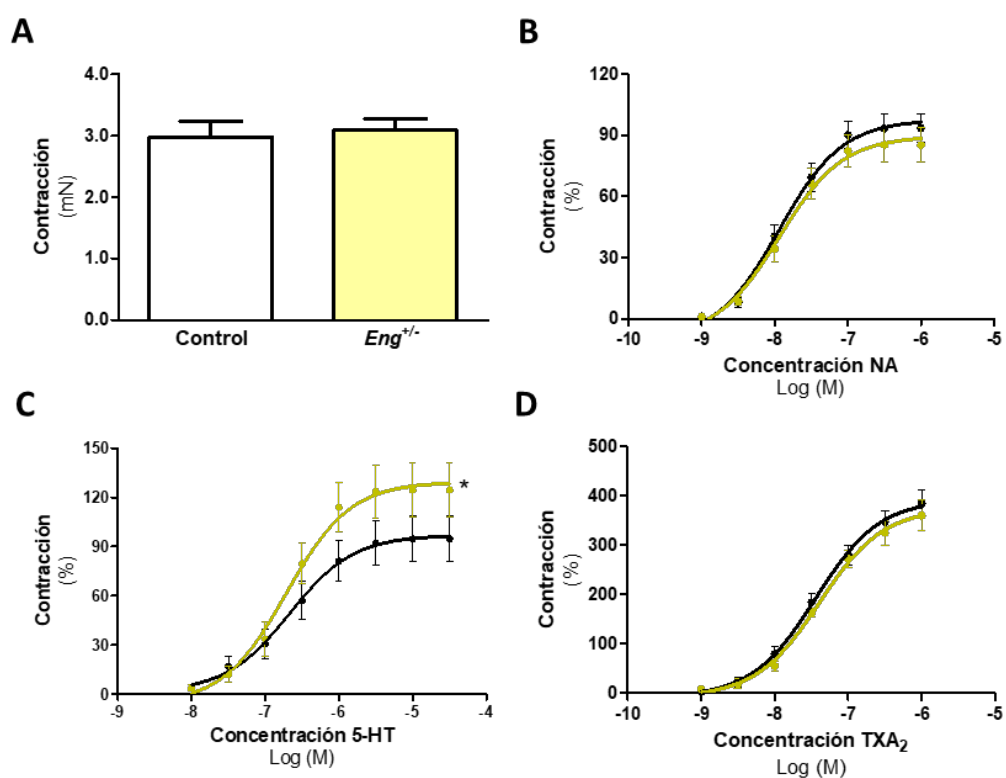


Figura 33. Análisis de la contracción de anillos de aorta procedentes de ratones *Eng*^{+/-}. (A) Cuantificación de la respuesta de los anillos a una solución hiperpotásica KPSS. Cada barra representa la media ± EEM. Control *Eng*^{+/+} (n = 20) y *Eng*^{+/-} (n = 20). Test estadístico t de Student. (B - D) Curva dosis respuesta ante agentes vasoconstrictores noradrenalina (B), serotonina (C) y tromboxano A₂ (D). Se representa el valor de y (contracción) interpolada para x (concentración). *Eng*^{+/+} se representa en negro (●) (n anillos = 20, n ratones = 5) y *Eng*^{+/-} en amarillo (●) (n anillos = 20, n ratones = 5). Test estadístico ANOVA. (*) p < 0,05.

La respuesta contráctil de los anillos ante la solución con alta concentración de potasio fue similar entre los anillos que proceden ratones *Eng^{+/-}* y los controles (Figura 33A). Esta respuesta no es dependiente de receptores, por esta razón, se utilizan estos datos para normalizar la respuesta contráctil de cada anillo, así disminuimos la variabilidad entre anillos.

Para analizar el efecto de las distintas sustancias vasoactivas, los anillos de aorta se sometieron a concentraciones crecientes de los distintos agentes vasoconstrictores (Hussain *et al.*, 2017). En las curvas dosis-respuesta obtenidas se puede observar que los anillos de aorta de ambos grupos tuvieron comportamientos muy similares en respuesta a noradrenalina y tromboxano A₂ (Figura 33B y D). Es en presencia de serotonina donde se observan diferentes curvas-respuesta. En esta situación, los anillos de aorta procedentes de ratones *Eng^{+/-}* muestran una contracción significativamente mayor que el grupo control (Figura 33C).

No obstante, este resultado no explicaría la dificultad de estos ratones para parar una hemorragia, ya que no se ha perdido la capacidad de generar un espasmo vascular frente a un daño, sino que, por el contrario, parecen poder contraer más que sus controles.

2.2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Uno de los componentes celulares más importantes y que tienen una respuesta más rápida en todo el proceso de hemostasia son las plaquetas. Muy brevemente, las plaquetas se activan y se adhieren a los componentes del subendotelio que han quedado expuestos (Versteeg *et al.*, 2013). Esa activación conlleva una serie de cambios entre los que destaca la agregación plaquetaria que genera un tapón plaquetario inicial, fundamental para cubrir el daño y detener la hemorragia. El correcto funcionamiento de las plaquetas

es imprescindible para un correcto proceso de hemostasia (Hiller, 2007). Por ello, decidimos estudiar si la dificultad que tienen estos ratones en detener una hemorragia se debía a un defecto en la funcionalidad plaquetaria.

2.2.1. Análisis *in vivo* de la respuesta plaquetaria a un estímulo protrombótico sistémico y agudo

Estudiamos *in vivo* la capacidad de respuesta de las plaquetas circulantes de los ratones ante un estímulo trombogénico agudo a nivel sistémico, inducido por la administración de un *bolus* IV de colágeno y epinefrina, ver Figura 34 (Miyazawa *et al.*, 2019).

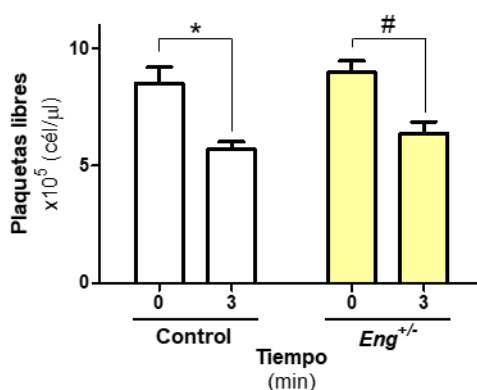


Figura 34. Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en el modelo de ratón *Eng^{+/-}*. Concentración de plaquetas libres en estado basal (t = 0 min) y 3 minutos después de la inyección de colágeno y epinefrina (t = 3 min), en ratones *Eng^{+/-}* y sus controles *Eng^{+/+}*. Cada barra representa la media ± EEM; Control *Eng^{+/+}* (n = 9) y *Eng^{+/-}* (n = 8). Test estadístico ANOVA. (*) p < 0,001; (#) p < 0,01

Como se puede observar, en ambos grupos de ratones, el número de plaquetas que se encuentran libres (no agregadas) circulando en la sangre disminuye tras 3 minutos de inducción del estado trombogénico (Figura 34). Esto indica que los agentes desencadenantes, el colágeno y la epinefrina, están generando la activación de las plaquetas que lleva a la generación de agregados plaquetarios, que es detectado por la disminución de las plaquetas libres.

Además, se puede observar que ambos grupos tienen una respuesta idéntica, lo que sugiere que la deficiencia de endogлина no afecta a la capacidad de generar agregados (Figura 34).

2.2.2. Estudio *in vitro* de la funcionalidad plaquetaria

A pesar de que el estudio *in vivo* apuntaba a que la deficiencia de endogлина no produce alteraciones en la funcionalidad plaquetaria, estudiamos *in vitro* su capacidad de activación y agregación (Figura 35). Así, podemos analizar de manera aislada y en condiciones controladas si deficiencias en el gen de endogлина afectan a la actividad plaquetaria.

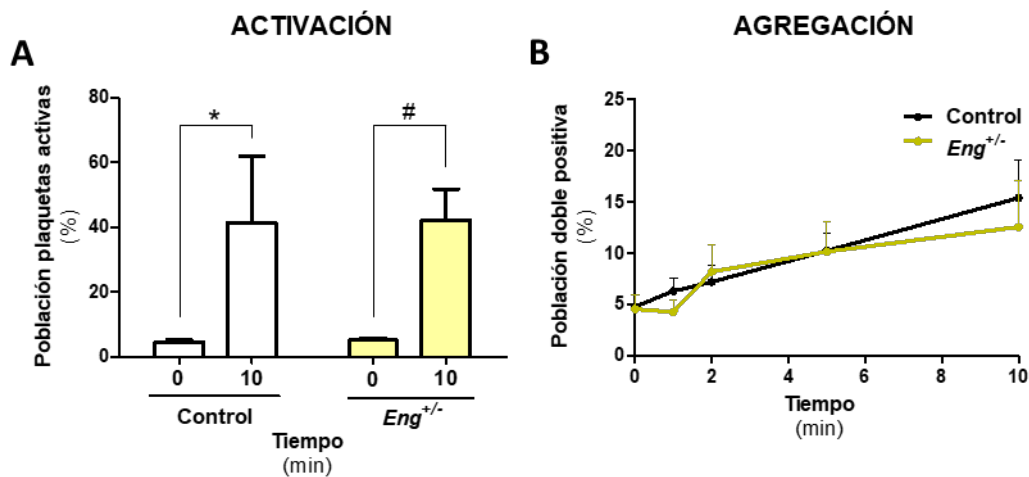


Figura 35. Estudio *in vitro* de la activación y agregación de plaquetas procedentes de ratones *Eng*^{+/-}. (A) Cuantificación del porcentaje de población de plaquetas activas en condiciones basales (t = 0 min) y tras 10 minutos de estimulación del activador trombina (t = 10 min). Cada barra representa media \pm EEM; Control (n = 6) y *Eng*^{+/-} (n = 7). Test estadístico ANOVA. (*, control *Eng*^{+/+} 0 min vs 10 min) p < 0,05; (#, *Eng*^{+/-} 0 min vs 10 min) p < 0,01. (B) Análisis del porcentaje de población doble positiva para CD9-PE y CD9-FITC durante 10 minutos de estimulación del agonista activador. Se representa el valor de la media \pm EEM de y (población doble positiva) interpolado con x (tiempo). Control *Eng*^{+/+} (n = 7) y *Eng*^{+/-} (n = 7). Test estadístico ANOVA.

En los resultados obtenidos en los estudios de activación se puede observar que el porcentaje de plaquetas activas en presencia de trombina aumenta en ambos grupos, lo que confirma que existe una respuesta de las plaquetas frente al agente utilizado para desarrollar el experimento. Si comparamos las

respuestas generadas en las plaquetas procedentes de los ratones *Eng^{+/-}* y de los ratones controles se observa que ambas son muy similares y que no existen diferencias estadísticamente significativas (Figura 35A).

Del mismo modo, en los estudios de agregación, se observa como el porcentaje de plaquetas agregadas aumenta conforme transcurre el tiempo en contacto con el agente activador (Figura 35B). Por lo que sí que existe una respuesta ante el agente activador. De manera similar a los resultados de activación, no existen diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de las plaquetas de animales *Eng^{+/-}* y su grupo control (Figura 35B).

Todo esto sugiere que la deficiencia de endogлина no afecta a la respuesta de las plaquetas ante un estímulo protrombótico.

2.3. ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA FIBRINÓLISIS

Para estudiar la fase de fibrinólisis, analizamos los principales componentes de la cascada de la fibrinólisis en plasmas procedentes de ratones *Eng^{+/-}* y sus controles, recogidos a distintos tiempos después de un evento trombótico agudo. Estos tiempos de recogida fueron seleccionados de acuerdo a lo descrito en la bibliografía, eligiendo los periodos donde se espera encontrar mayores concentraciones de cada uno de los componentes. Se analizaron los niveles de cada uno de estos componentes antes, con motivo de conocer los niveles basales, y después del evento trombótico, ver Figura 36.

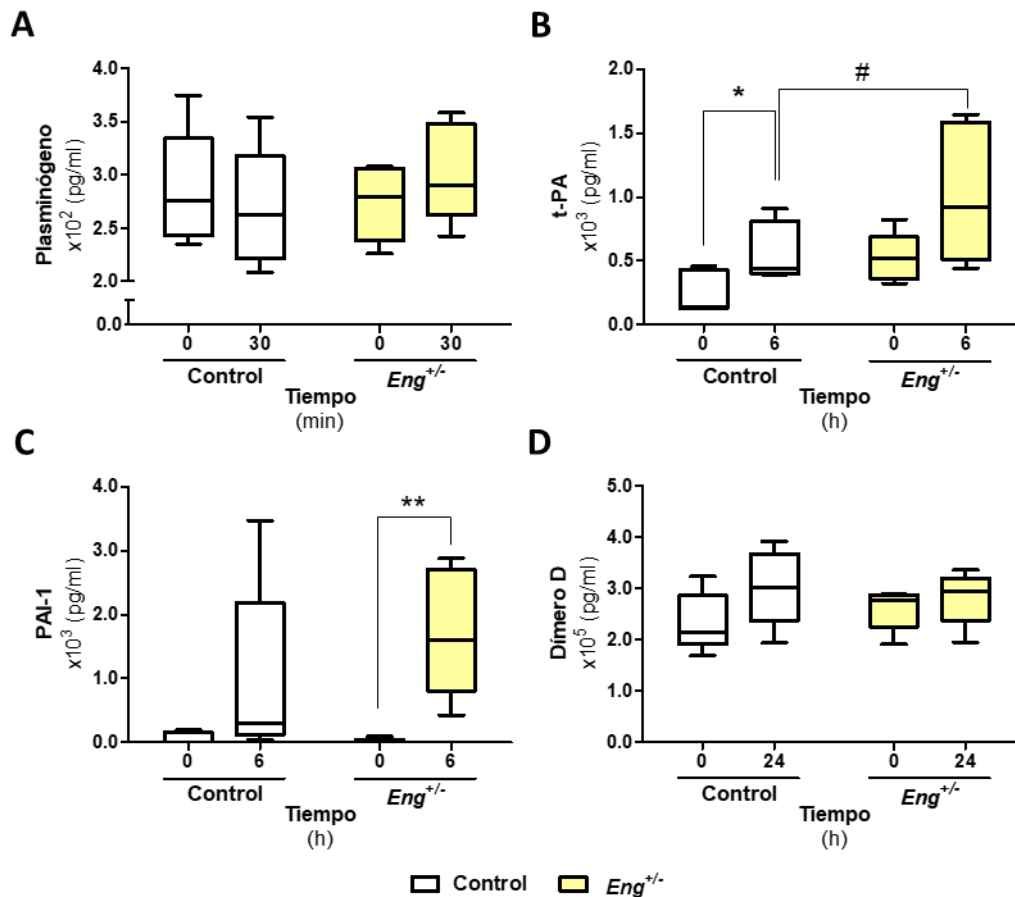


Figura 36. Análisis de la concentración plasmática de los principales componentes de la fibrinólisis en ratones *Eng*^{+/-}. Cuantificación de la concentración de los principales componentes de la fibrinólisis: (A) Plasminógeno, (B) t-PA, (C) PAI-1 y (D) Dímero D. Se encuentran representados sus niveles basales (t = 0 min; t = 0 h) y los niveles tras un evento trombótico agudo (t = 30 min; t = 6 h; t = 6 h y t = 24 h, respectivamente). Se representa un *box plot* 10-90 percentil. Control *Eng*^{+/+} (n = 5) y *Eng*^{+/-} (n = 5). Test estadístico ANOVA de dos vías. (*; #) p < 0,05; (**) p < 0,01.

En todos los casos tomamos como referencia los niveles del grupo control para comparar los resultados obtenidos en las muestras de plasma de los ratones haploinsuficientes para endogлина.

A la vista de los resultados podemos observar que la concentración de plasminógeno es similar a la del grupo control y apenas varía tras 30 minutos de la inducción del evento trombótico (Figura 36A).

Con respecto a los niveles de t-PA, la enzima que convierte el plasminógeno a la enzima activa plasmina, se observa cómo los niveles

basales de los ratones *Eng*^{+/-} tienden a ser superiores con respecto a sus controles (Figura 36B; t = 0 h; WT vs *Eng*^{+/-}). Además, tras 6 horas desde el evento trombótico, los niveles de t-PA de ambos grupos aumentan de manera significativa. Cabe destacar que la concentración de t-PA en los ratones *Eng*^{+/-} a las 6 horas tiene valores mucho mayores que los animales control y que este aumento es estadísticamente significativo (Figura 36B; t = 6 h; WT vs *Eng*^{+/-}).

De acuerdo con los niveles obtenidos del inhibidor del activador, el PAI-1, podemos observar que los niveles basales de los ratones haploinsuficientes tienden a ser menores y que, de nuevo, ante un evento trombótico los niveles de ambos grupos aumentan muy significativamente (Figura 36C), sin que existan diferencias en la respuesta entre los niveles de los controles y los *Eng*^{+/-}.

Por último, el producto de desecho que estudiamos fue el dímero D, por ser uno de los más descritos y con más valor predictivo como biomarcador (Khalafallah *et al.*, 2014). Se puede observar en la Figura 36D que los niveles tienden a ser más elevados en ambos grupos, tras la generación de un evento trombótico, sin llegar a existir diferencias significativas.

2.4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO

Está descrito que las células endoteliales juegan un papel indispensable en cada una de las fases de la hemostasia, incluida la estabilización del trombo recién formado (Yau, Teoh and Verma, 2015). Tras la generación del tapón plaquetario es necesaria la formación de uniones secundarias que ayudan a generar un trombo robusto y estable que no sea arrastrado por la fuerza que ejerce el torrente sanguíneo (Eckly *et al.*, 2011). Por esta razón, diseñamos varios experimentos de adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales procedentes de cultivo primario.

2.4.1. Análisis de la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales procedentes de cultivo primario de ratones *Eng^{+/-}*

La idea de que las plaquetas podrían interaccionar con el endotelio surge a partir de hechos descritos en la bibliografía. En primer lugar, existe un grupo de las integrinas, altamente expresadas en la superficie plaquetaria, que interaccionan con el dominio RGD (Lum, Reid and Blobel, 1998). Este dominio RGD se encuentra en una gran cantidad de proteínas, como por ejemplo la endogлина (Gougos and Letarte, 1990). Además, resultados previos muestran que endogлина interacciona con las integrinas de los leucocitos, y de las plaquetas (Rossi, Lopez-Novoa and Bernabeu, 2014; Rossi *et al.*, 2018). En concreto, el estudio de Rossi sobre la interacción de la endogлина endotelial con las integrinas plaquetarias, demuestra que el silenciamiento, mediante siRNA, de endogлина provoca alteraciones en la adhesión. Sin embargo, en una situación de haploinsuficiencia, la modificación de la expresión de endogлина es mucho menos acusada. Por esta razón, quisimos comprobar si esta interacción pudiera verse afectada por la deficiencia de endogлина de las células procedentes de ratones *Eng^{+/-}*.

Para realizar este estudio, se diseñaron dos técnicas experimentales, ambas basadas en un procedimiento similar, donde sobre una monocapa de células endoteliales WT o deficientes en endogлина, se añaden plaquetas teñidas. Tras su activación, y tras un periodo de incubación, se cuantifica el número de trombocitos que han sido capaces de adherirse a estas células endoteliales. Ambos experimentos son muy similares, con la diferencia de que en el procedimiento estático y se analiza las plaquetas que se han adherido, previo lavado. Mientras que en el procedimiento dinámico se hace incidir un flujo constante de 0,4 ml/min durante dos minutos y, posteriormente, se analizan las plaquetas que resisten a dicho flujo.

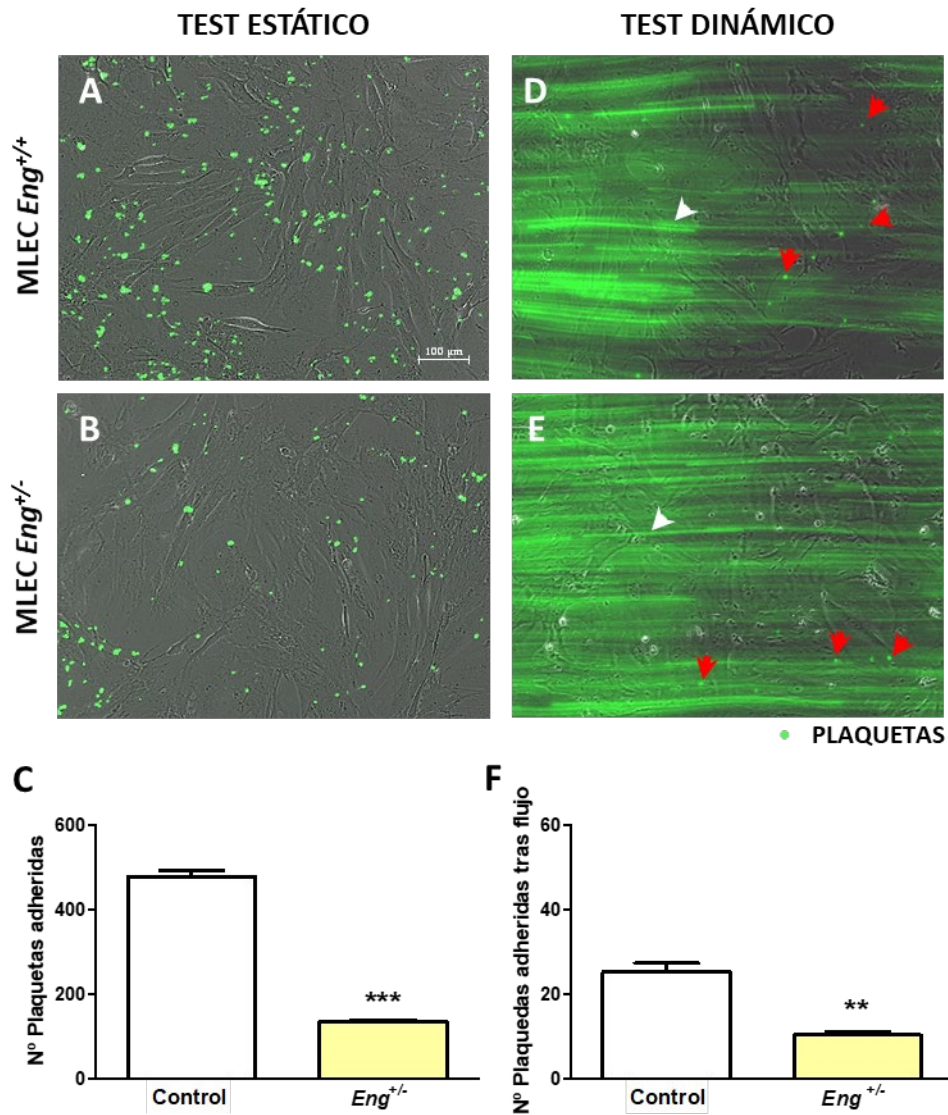


Figura 37. Estudio de la adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales de cultivo primario de ratones $Eng^{+/-}$. (A-B, D-E) Imágenes representativas de la monocapa de células MLEC procedentes de ratones $Eng^{+/+}$ (A y D) y ratones $Eng^{+/-}$ (B y E) y las plaquetas adheridas, marcadas con calceína verde. A y B representan el estudio de adhesión en condiciones estáticas y D - E representan el estudio de las plaquetas que han permanecido unidas tras ser sometidas a un flujo de 0,4 ml/min durante 2 min. La flecha blanca señala el flujo y las flechas rojas indican las plaquetas adheridas a la monocapa. Microfotografías obtenidas mediante cámara acoplada a un microscopio óptico y de fluorescencia con 10 aumentos. (C y F) Cuantificación del número de plaquetas adheridas a la monocapa de células endoteliales en condiciones estáticas y dinámicas, respectivamente. En los diagramas de barras, se representa la media \pm EEM; $Eng^{+/+}$ (n = 10) y $Eng^{+/-}$ (n = 10). Test estadístico t de Student. (***) $p < 0,001$; (***) $p < 0,001$.

Al realizar los experimentos, se observa cómo hay significativamente menos plaquetas que se han adherido sobre la monocapa de células endoteliales que provienen del ratón modelo de HHT (Figura 37A-C).

En los experimentos dinámicos, las plaquetas oponen menos resistencia a ser arrastradas por este flujo cuando están adheridas a las células haploinsuficientes para el gen de endogлина, por lo que se observa un número significativamente menor de plaquetas unidas a las células endoteliales que proceden de ratones haploinsuficientes (Figura 37D-F).

Estos resultados sugieren que, en una situación donde las células endoteliales expresen menos endogлина, las plaquetas se adhieren menos y, además, esa unión plaqueta-endotelio es más débil y menos resistente al flujo.

2.4.2. Estudio *in vivo* de la estabilización del trombo

El hecho de que la deficiencia de endogлина puede afectar a la adhesión de las plaquetas en un estado protrombótico sobre el endotelio activo, nos lleva a pensar que posiblemente esto afecte al proceso de hemostasia, en concreto la estabilización del trombo.

Para comprobar este hecho realizamos un procedimiento experimental *in vivo* en el que se induce una situación de trombosis local mediante la aplicación de cloruro férrico sobre un vaso sanguíneo de gran tamaño, la arteria carótida. Durante el experimento, se estudia el crecimiento del trombo y si en algún momento este es arrastrado por el flujo, a partir de la medida del flujo de sangre que pasa por la carótida. Cuanto más tarde en generarse un trombo lo suficientemente estable y grande como para no ser arrastrado por el flujo y ocluir por completo el vaso, menos capacidad de estabilización del trombo tendrá el animal, ver Figura 38.

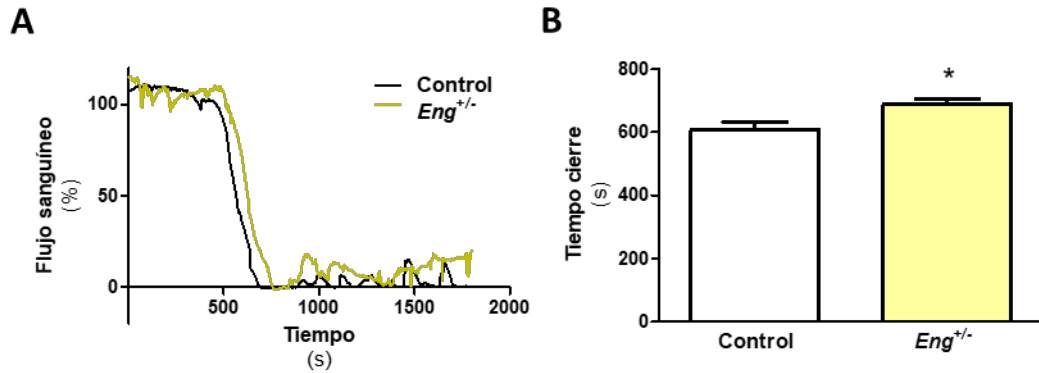


Figura 38. Estudio local del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones *Eng^{+/-}*. (A) Media de los registros de flujo en la carótida tras administrar localmente FeCl₃ (t = 0 s). Se representa el valor de *y* (flujo sanguíneo (%)) interpolado con el valor de *x* (tiempo (s)). (B) Cuantificación del tiempo que tarda en detenerse el flujo permanentemente. Cada barra representa la media ± EEM. Control, *Eng^{+/+}* (n = 5) y *Eng^{+/-}* (n = 5). Test estadístico t de Student, (*) p < 0,05.

De acuerdo con los resultados podemos observar que los ratones *Eng^{+/-}* necesitan más tiempo para generar un trombo lo suficientemente grande y estable como para ocluir la luz de la carótida y detener el flujo (Figura 38). Este periodo de tiempo es significativamente mayor en los ratones deficientes en endoglina (Figura 38B), lo que sugiere que una menor expresión de endoglina afecta a la generación de trombos estables, es decir a la estabilización del trombo.

3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO EN RATONES CON SOBREEXPRESIÓN DE ENDOGLINA

A la vista de los resultados obtenidos en ratones haploinsuficientes *Eng^{+/-}*, donde en los experimentos *in vitro* de adhesión de plaquetas activas sobre células endoteliales se observa que la deficiencia de endoglina afecta a la unión de las plaquetas al endotelio activo y los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* muestran que la falta de endoglina afecta a la

estabilización del trombo; quisimos analizar si existe una relación directa entre la expresión de endogлина y la adhesión del trombo.

Para ello empleamos un modelo de ratón transgénico que expresa endogлина humana bajo el control de un promotor que hace que se exprese continuamente y en todos los tipos celulares. Denominaremos a este ratón, *ENG*⁺ (Figura 39).

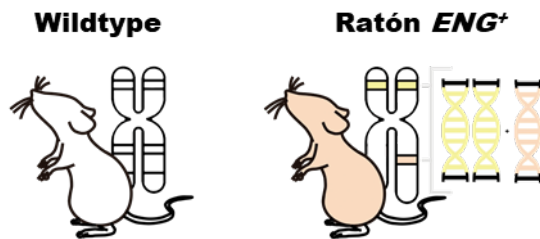


Figura 39. Ratones con sobreexpresión de endogлина humana y ratones *wild type* utilizados como grupo control. Los ratones *ENG*⁺ conservan las dos copias del gen *Eng* y además se han modificado genéticamente para que sobreexpresen el gen humano de *ENG*.

En primer lugar, analizamos el efecto de la sobreexpresión de endogлина sobre la capacidad de adhesión de plaquetas activas sobre células endoteliales de cultivo primario. Para ello se obtuvieron las células endoteliales de cada uno de los grupos de ratón (ratones *ENG*⁺ y ratones WT), mientras que las plaquetas se obtuvieron en ambos casos de ratones WT. Esta situación simula que la sobreexpresión de endogлина sólo se encuentra en el endotelio (Figura 40).

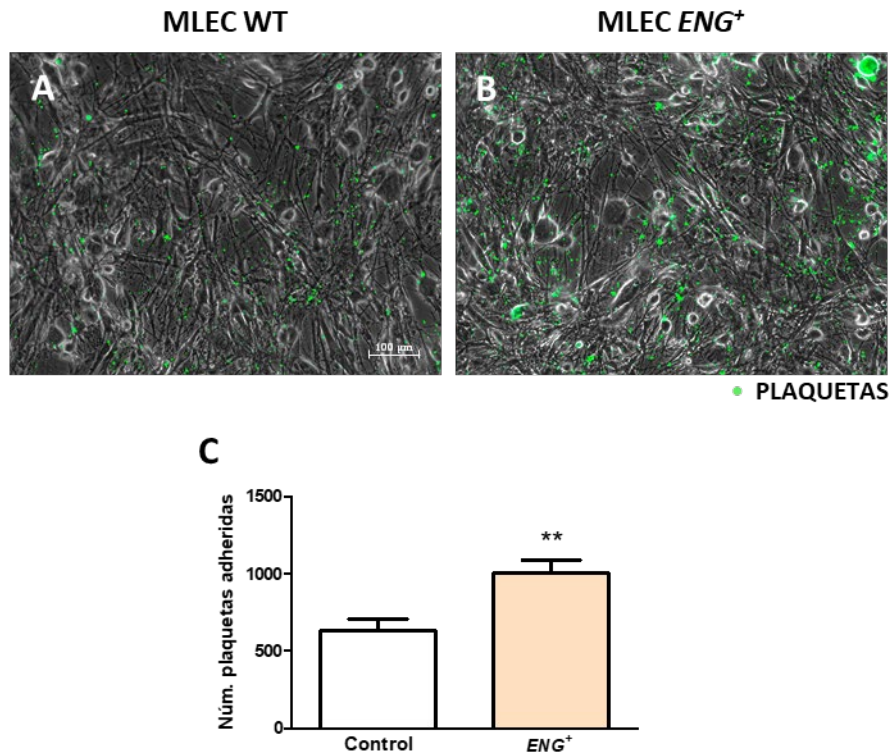


Figura 40. Estudio de adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales que sobreexpresan endoglina. (A-B) Imágenes representativas de la monocapa de células MLEC procedentes de ratones WT (A) y ratones *ENG⁺* (B) a las que se han adherido plaquetas, marcadas en verde. Microfotografías obtenidas mediante cámara acoplada a un microscopio óptico y de fluorescencia con 10 aumentos. (C) Cuantificación del número de plaquetas adheridas a la monocapa de células endoteliales WT y *ENG⁺*. Cada barra representa la media ± EEM. Control WT (n = 12) y *ENG⁺* (n = 12). Test estadístico t de Student (**) $p < 0,01$.

A la vista de los resultados se puede observar que, de manera inversa a lo que veíamos en los experimentos *in vitro* realizados con las células MLEC procedentes de ratones *Eng^{+/-}*, cuando las células endoteliales sobreexpresan endoglina un número significativamente mayor de plaquetas se adhieren a ellas, comparado con el grupo control (Figura 40B y C).

Por otra parte, realizamos los experimentos *in vivo* de estabilización del trombo en los animales *ENG⁺* (Figura 41).

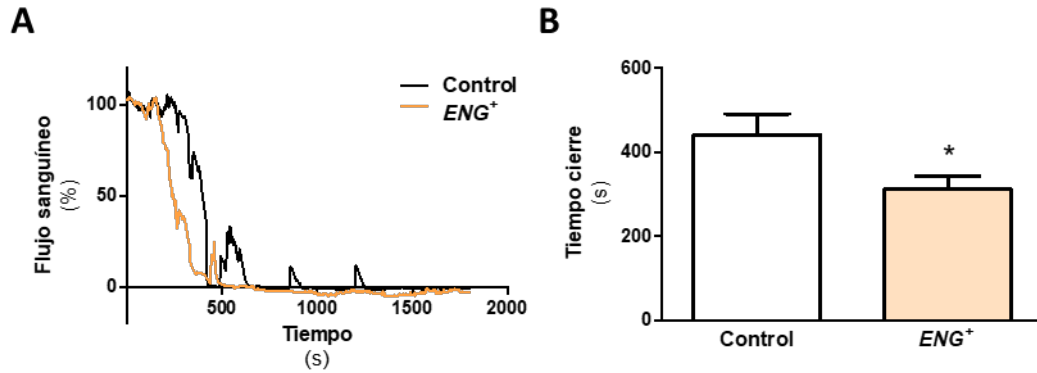


Figura 41. Estudio del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones que sobreexpresan *ENG*. (A) Media de los registros de flujo en la carótida tras administrar localmente FeCl_3 ($t = 0$ s). Se representa el valor de y (flujo sanguíneo (%)) interpolado con el valor de x (tiempo (s)). (B) Cuantificación del tiempo que tarda en detenerse el flujo permanentemente. Cada barra representa la media \pm EEM. Control WT ($n = 6$) y *ENG*⁺ ($n = 8$). Test estadístico t de Student. (*) $p < 0,05$.

Observamos que tras inducir una trombogénesis local con FeCl_3 , los ratones que sobreexpresan endoglina necesitan menos tiempo para generar un trombo lo suficientemente grande y estable como para ocluir la luz de la carótida. Por una parte, observamos en el registro de flujo que los ratones *ENG*⁺ el flujo de sangre cae hasta valores de 0 - 10% antes que los ratones WT (Figura 41A). Esta detención permanente del flujo se cuantifica en la gráfica de la Figura 41B, donde se confirma que necesitan menos tiempo para generar este coágulo estable.

Estos resultados confirman que existe una relación directa entre la expresión de endoglina y la estabilización del trombo, puesto que se observa que menos endoglina implica menos estabilización del trombo, mientras que la sobreexpresión de endoglina genera un trombo más estable en menos tiempo.

3.1. ESTUDIO DE RESPUESTAS GENERALES HEMOSTÁTICAS

Por último, quisimos estudiar si estos ratones tenían alteraciones hemostáticas como consecuencia de la modificación genética. Por ello, desarrollamos los experimentos más significativos que nos dan información general de lo que ocurre en las otras fases de la hemostasia.

3.1.1. Estudios de tiempo de sangrado en ratones con sobreexpresión de endoglina

Al estudiar el tiempo total de sangrado observamos que no existen diferencias entre los ratones ENG^+ y sus controles WT en el tiempo que tardan en parar la hemorragia (Figura 42). Este resultado demuestra que, a pesar de que la mayor presencia de endoglina aumenta la estabilidad del trombo, no produce una respuesta hemostática exacerbada.

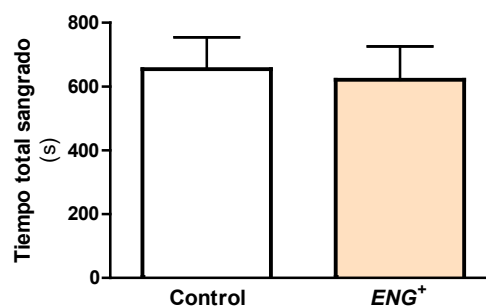


Figura 42. Tiempo de sangrado total de los ratones que sobreexpresan ENG . Análisis de la suma de todos los tiempos en los que la hemorragia está activa, o tiempo total de sangrado. El diagrama de barras representa la media \pm EEM; Control WT (n = 15) y ENG^+ (n = 16). Test estadístico U de Mann Whitney.

3.1.2. Análisis *in vivo* de la respuesta plaquetaria frente a un estímulo protrombótico

Como hemos explicado, estos ratones tienen sobreexpresión de endoglina ubicua, por lo que podría haber mayor expresión de endoglina en las plaquetas y esto podría afectar a su funcionalidad. Por esta razón, realizamos

los experimentos *in vivo* de respuesta de las plaquetas a un estímulo protrombótico sistémico y agudo, ver Figura 43.

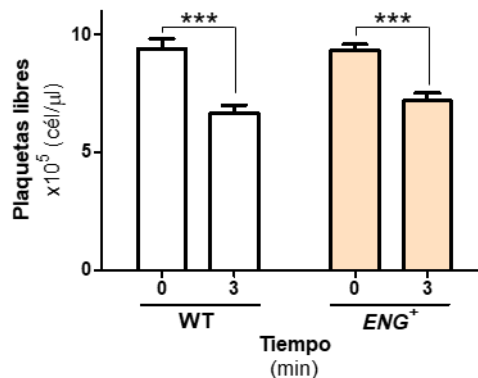


Figura 43. Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en ratones con sobreexpresión de *ENG*. Concentración de plaquetas libres en estado basal (t = 0 min) y 3 minutos después de la inyección de colágeno y epinefrina (t = 3 min), en ratones *ENG*⁺ y sus controles WT. Cada barra representa la media ± EEM; Control (n = 9) y *ENG*⁺ (n = 8). Test estadístico ANOVA. (***) p < 0,001.

Como se puede observar las plaquetas de ambos grupos de estudio, *ENG*⁺ y sus cotroles WT, responden al estímulo protrombótico, puesto que en ambos grupos disminuye el número de plaquetas libres circulantes tras 3 minutos de la estimulación.

Además, ambos muestran un patrón muy similar de respuesta, no hay diferencias en el número de plaquetas circulantes antes y después del estímulo protrombótico (Figura 43). Así, parece que las plaquetas de los ratones *ENG*⁺ tienen un comportamiento normal y no han perdido ni adquirido más capacidad de respuesta como consecuencia de las modificaciones genéticas.

4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ALK1 SOBRE LA HEMOSTASIA

Del mismo modo que se han realizado los experimentos en los modelos de ratón HHT1, realizamos el estudio en el segundo modelo animal, HHT2, con el fin de encontrar posibles alteraciones en el sistema de hemostasia como consecuencia de la deficiencia genética de *Alk1*.

4.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ALK1 SOBRE LA RESPUESTA VASOCONSTRICTORA ARTERIAL

Se estudió si secciones de aorta procedentes de los ratones modelo *Alk1*^{+/-} habían perdido su capacidad contráctil como consecuencia de una haploinsuficiencia de *Alk1* (Figura 44). Como ya se ha explicado, este espasmo vascular es importante en una de las primeras fases del proceso de hemostasia, ya que disminuye el flujo sanguíneo localmente por disminuir la luz del vaso.

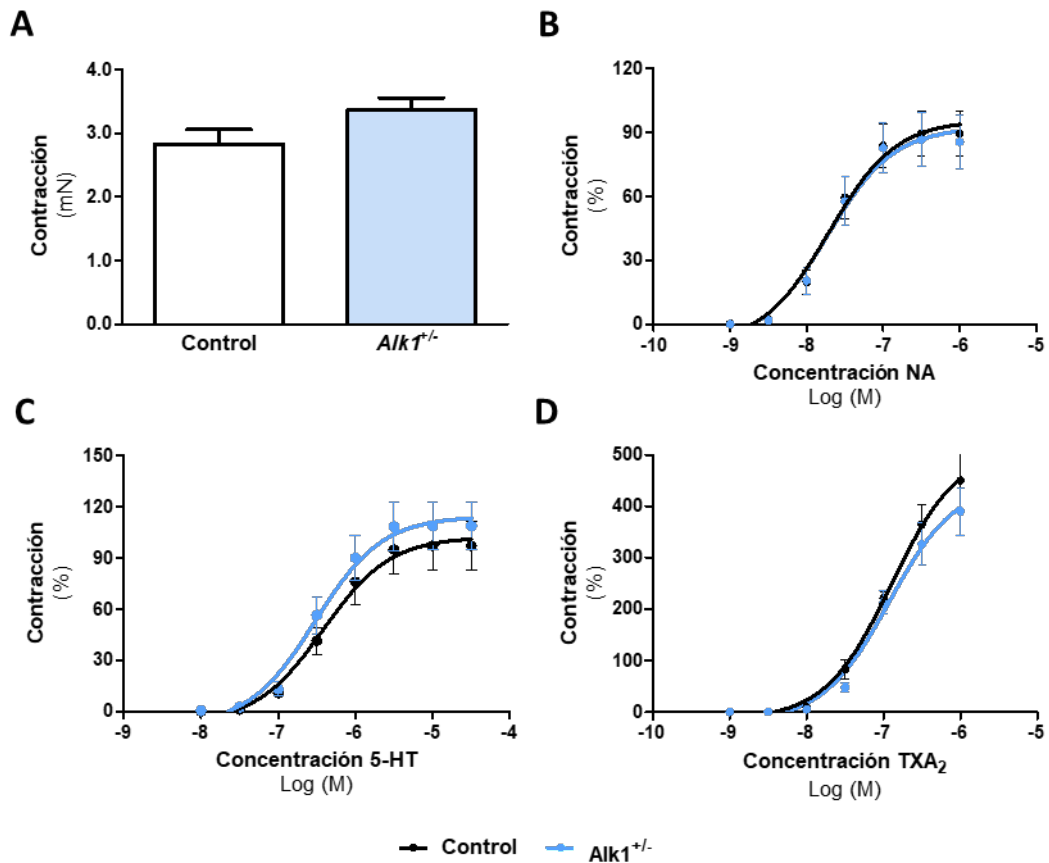


Figura 44. Análisis de la contracción de anillos de aorta procedentes de ratones *Alk1^{+/-}*. (A) Cuantificación de la respuesta de los anillos a una solución hiperpotásica o KPSS. Cada barra representa la media \pm EEM. Control *Alk1^{+/+}* (n = 20) y *Alk1^{+/-}* (n = 20). Test estadístico t de Student. (B - D) Curva dosis respuesta ante agentes vasoconstrictores Noradrenalina (B), serotonina (C) y tromboxano A₂ (D). Se representa el valor de y (contracción (%)) interpolada para x (concentración (Log M)). *Alk1^{+/+}* se representa en negro (•) (n anillos = 20, n ratones = 5) y *Alk1^{+/-}* en azul (•) (n anillos = 20, n ratones = 5). Test estadístico ANOVA.

Como se puede observar en los resultados recogidos en la **Figura 44A** no existen diferencias en la respuesta de los vasos a una solución hiperpotásica, aunque cabe destacar que hay una pequeña tendencia de los anillos procedentes de ratones HHT2 a contraerse más. Por esta razón, los datos obtenidos en los experimentos de dosis-respuesta fueron corregidos por este parámetro KPSS, así se reduce la variabilidad entre anillos.

En los experimentos realizados con diferentes agentes vasoconstrictores, no se observan diferencias en la respuesta contráctil de los vasos frente a noradrenalina, serotonina o tromboxano A₂ (**Figura 44B-D**). Por lo que se

descarta que la deficiencia genética de *Alk1* esté afectando a la contracción de los vasos y por extensión a la fase de espasmo vascular de la hemostasia.

4.2. ESTUDIO DE HEMOSTASIA PRIMARIA EN RATONES DEFICIENTES EN *Alk1*

Para estudiar si la deficiencia de *Alk1* afecta a la funcionalidad plaquetaria, o hemostasia primaria, generamos una serie de experimentos donde se analiza la respuesta de los trombocitos a diferentes agentes protrombogénicos.

4.2.1. Análisis *in vivo* de la respuesta plaquetaria a un estímulo protrombótico sistémico y agudo

Estudiamos la capacidad de respuesta de las plaquetas circulantes del modelo *Alk1^{+/-}* ante un estímulo trombogénico agudo a nivel sistémico, inducido por la administración de un *bolus IV* de colágeno y epinefrina (Figura 45).

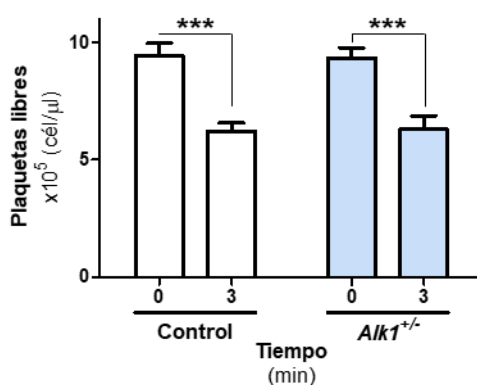


Figura 45. Estudio de la concentración de plaquetas tras un evento trombogénico en el modelo de ratón *Alk1^{+/-}*. Concentración de plaquetas libres en estado basal (t = 0 min) y 3 minutos después de la inyección de colágeno y epinefrina (t = 3 min), en ratones *Alk1^{+/-}* y sus controles *Alk1^{+/+}*. Cada barra representa la media \pm EEM; Control *Alk1^{+/+}* (n = 9) y *Alk1^{+/-}* (n = 8). Test estadístico ANOVA. (***) p < 0,001.

Los resultados muestran que, en ambos grupos experimentales, *Alk1*^{+/-} y sus controles, el número de plaquetas libres que se encuentran circulando en la sangre disminuye tras 3 minutos desde la administración de los agonistas protrombóticos (Figura 45). Esto indica que estos fármacos están generando una respuesta que lleva a la agregación de las plaquetas, es decir, a la trombogénesis.

Por otra parte, los datos recogidos en el gráfico de barras muestran dos perfiles de respuesta muy similares entre el grupo modelo HHT2 y sus controles. Estos resultados sugieren que la deficiencia en *Alk1* no genera en los ratones defectos en la capacidad agregante de las plaquetas y, por extensión, tampoco en su activación, ya que no es posible la agregación sin la activación.

4.2.2. Estudio *in vitro* de la funcionalidad plaquetaria

Al igual que en los ratones deficientes en endoglina, realizamos un estudio *in vitro* con la finalidad de comprobar de manera más específica que las dos funciones más importantes de las plaquetas, activación y agregación, no están alteradas por la deficiencia genética de *Alk1* (Figura 46).

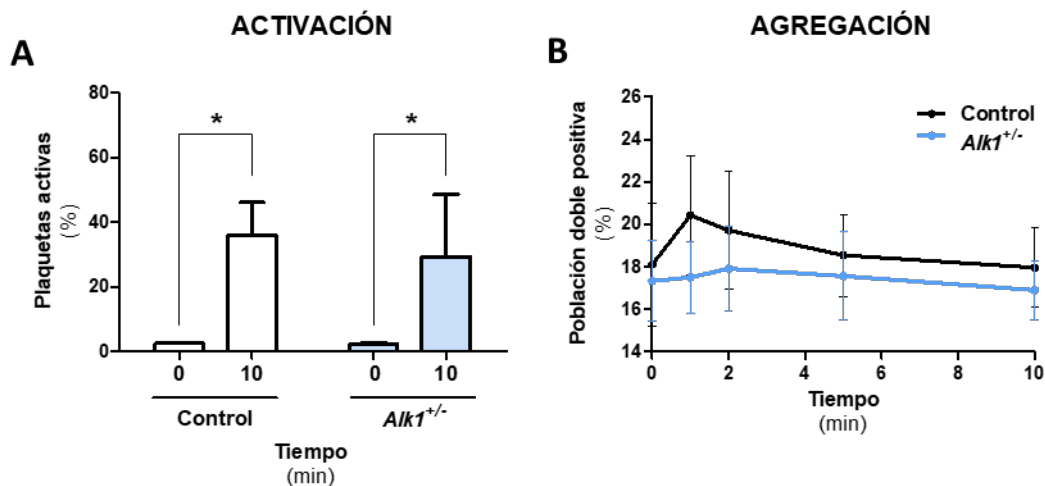


Figura 46. Estudio *in vitro* de la activación y agregación de plaquetas procedentes de ratones modelo de *Alk1*^{+/-}. (A) Cuantificación del porcentaje de población de plaquetas activas en condiciones basales (t = 0 min) y tras 10 minutos de estimulación del activador trombina (t = 10 min). Cada barra representa media ± EEM; Control *Alk1*^{+/+} (n = 5) y *Alk1*^{+/-} (n = 5). Test estadístico ANOVA. (*) p < 0,05. (B) Análisis del porcentaje de población doble positiva para CD9-PE y CD9-FITC durante 10 minutos de estimulación del agonista activador. Se representa el valor de la media ± EEM de y (población doble positiva (%)) interpolado con x (tiempo (min)). Control *Alk1*^{+/+} (n = 5) y *Alk1*^{+/-} (n = 5). Test estadístico ANOVA.

En los resultados de activación, mostrados en la Figura 46A, se puede observar que el porcentaje de plaquetas activas aumenta tras 10 minutos de incubación con el agente activador, trombina. Lo que sugiere que existe una respuesta de activación de las plaquetas en contacto con el fármaco protrombótico. Por otra parte, se observa un perfil de respuesta muy similar entre el grupo *Alk1*^{+/-} y su grupo control. Este hecho ocurre en ambos experimentos, tanto en los de activación como en los de agregación (Figura 46A-B). Esto sugiere que las plaquetas procedentes de los animales deficientes en *Alk1* tienen un comportamiento similar a las del grupo control ya que no se han encontrado diferencias significativas.

4.3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE *ALK1* EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO

Ya hemos visto que los ratones deficientes de endogлина presentan alteraciones en la adhesión de las plaquetas al endotelio y, por ello, en la estabilización del trombo. Por lo tanto, decidimos analizar si la disminución de *Alk1* podría afectar al endotelio de manera similar y producir también alteraciones en la estabilidad del endotelio.

4.3.1. Análisis de la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales procedentes de cultivo primario de ratones *Alk1^{+/-}*

Como ya hemos explicado, analizamos *in vitro* la adhesión de las plaquetas mediante un test de adhesión en estático y otro de resistencia al flujo. Los resultados muestran que las plaquetas tienen tendencia a adherirse menos a la superficie de las células endoteliales haploinsuficientes para *Alk1* (Figura 47A-C). Sin embargo, esta disminución no llega a ser estadísticamente significativa. De hecho, en los resultados obtenidos en el test dinámico, no se observan diferencias en la resistencia al flujo de las plaquetas adheridas a la superficie endotelial (Figura 47D-F).

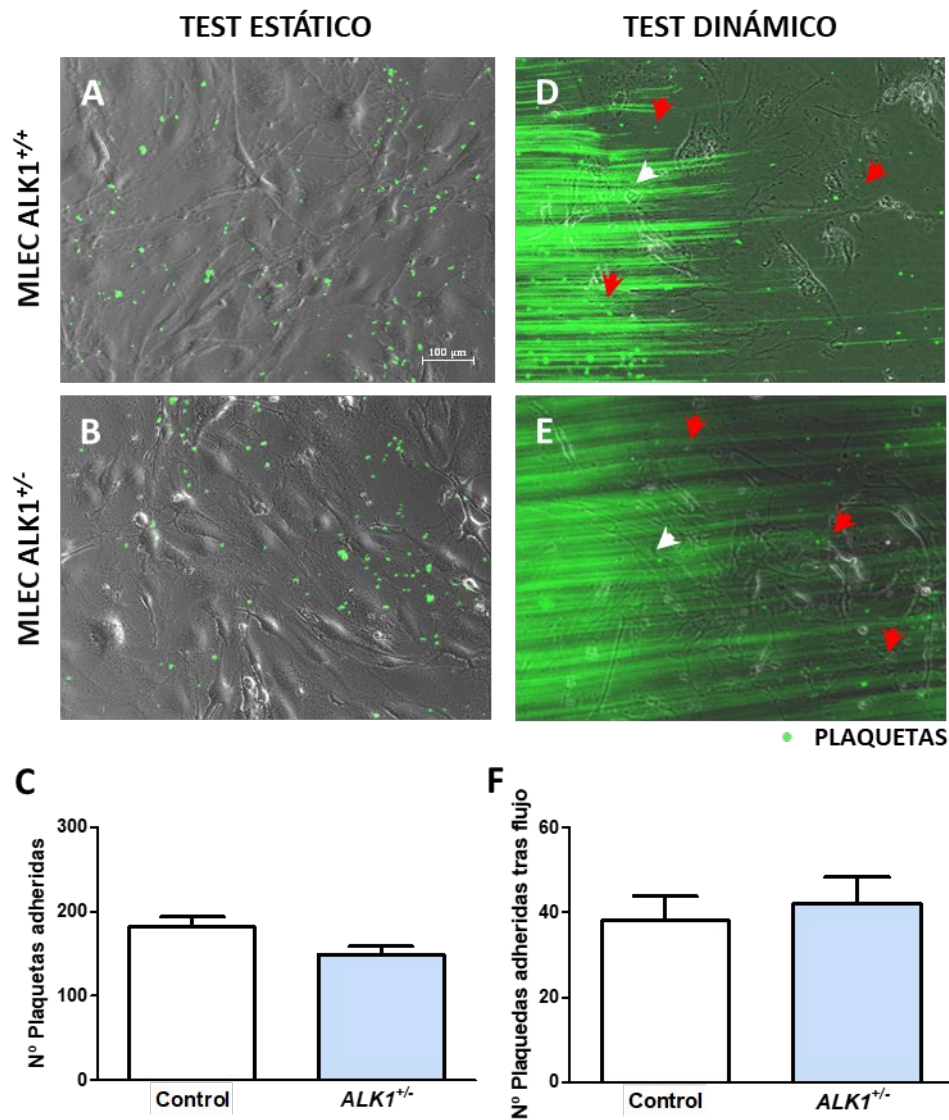


Figura 47. Estudio de la adhesión de plaquetas sobre una monocapa de células endoteliales de cultivo primario de ratones *Alk1*^{+/-}. (A-B, D-E) Imágenes representativas de la monocapa de células MLEC procedentes de ratones *Alk1*^{+/+} (A y D) y ratones *Alk1*^{+/-} (B y E) y las plaquetas adheridas, marcadas con calceína verde. A y B representan el estudio de adhesión en condiciones estáticas y D - E representan el estudio de las plaquetas que han permanecido unidas tras ser sometidas a un flujo de 2 dyne/cm² durante 2 min. La flecha blanca señala el flujo y las flechas rojas indican las plaquetas adheridas a la monocapa. Microfotografías obtenidas mediante cámara acoplada a un microscopio óptico y de fluorescencia con 10 aumentos. (C y F) Cuantificación del número de plaquetas adheridas a la monocapa de células endoteliales en condiciones estáticas y dinámicas, respectivamente. En los diagramas de barras, se representa la media ± EEM; *Alk1*^{+/+} (n = 10) y *Alk1*^{+/-} (n = 10). Test estadístico t de Student.

4.3.2. Estudio *in vivo* de la estabilización del trombo en ratones $Alk1^{+/-}$

Además del estudio *in vitro*, analizamos *in vivo* si el proceso de estabilización de un trombo recién formado estaba alterado como consecuencia de la deficiencia de $Alk1$ (Figura 48).

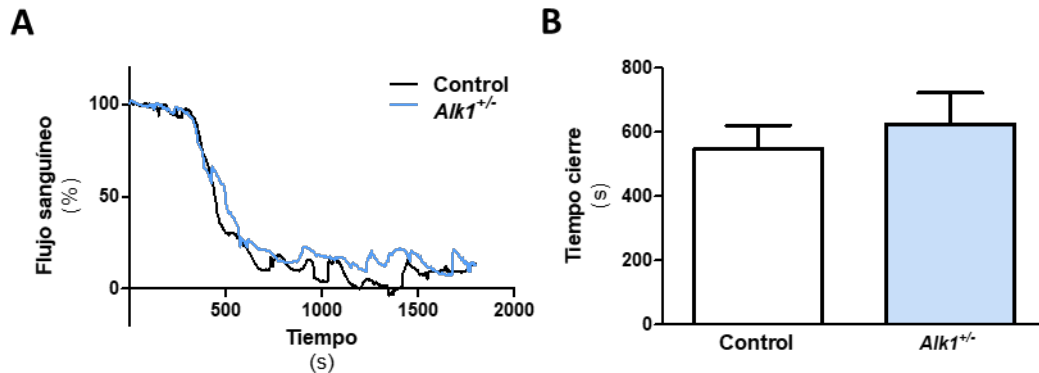


Figura 48. Estudio del flujo del interior de la carótida ante una trombosis inducida por cloruro férrico en ratones $Alk1^{+/-}$. (A) Media de los registros de flujo en la carótida tras administrar localmente $FeCl_3$ ($t = 0$ s). Se representa el valor de y (flujo sanguíneo (%)) interpolado con el valor de x (tiempo (s)). (B) Cuantificación del tiempo que tarda en detenerse el flujo permanentemente. Cada barra representa la media \pm EEM. Control $Alk1^{+/+}$ ($n = 10$) y $Alk1^{+/-}$ ($n = 12$). Test estadístico t de Student.

Los resultados obtenidos recogidos en la Figura 48A muestran que existe un leve retraso en el tiempo que tardan los ratones HHT2 comparado con los animales del grupo control. Sin embargo, esta tendencia a tardar más tiempo en formar un trombo, lo suficientemente grande y estable como para ocluir la luz de la carótida, no es significativamente mayor con respecto a sus controles (Figura 48B).

4.4. ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL PROCESO DE FIBRINÓLISIS

Al no encontrar diferencias en la estabilización del trombo y teniendo en cuenta que en el modelo de deficiencia de endogлина se observaban ligeras alteraciones en el proceso de fibrinólisis, analizamos los principales componentes de la cascada de la fibrinólisis en plasmas procedentes de

ratones modelo HHT2 y sus controles. Al igual que con el otro modelo de ratón, las muestras de sangre fueron recogidas en distintos tiempos, con objeto de poder encontrar los cambios que ocurren en las cuatro moléculas más importantes de este proceso, es decir, plasminógeno, t-PA, PAI-1 y productos de degradación, como el dímero D.

En los resultados obtenidos se observa que los niveles basales de plasminógeno de los animales *Alk1^{+/-}* son muy similares con respecto a los controles (Figura 49A; t = 0 min; WT vs *Alk1^{+/-}*). Sin embargo, tras 30 minutos desde el evento trombótico, sólo aumenta la concentración en el plasma procedente de ratones *Alk1^{+/-}*, siendo este aumento estadísticamente significativo (Figura 49A; t = 0 min vs t = 30 min).

En lo que se refiere a la concentración basal de t-PA, los ratones *Alk1^{+/-}* tienden a tener valores inferiores a los del grupo control (Figura 49B; t = 0 h; WT vs *Alk1^{+/-}*). Tras 6h desde la inducción de la trombogénesis, se produce un aumento de los valores de t-PA en ambos grupos (Figura 49B; t = 0 vs 6 h). Sin embargo, este aumento es mucho mayor en los animales *Alk1^{+/-}*, es decir, la deficiencia de Alk1 genera un incremento superior de los niveles de t-PA comparado con el grupo control. Tener niveles más elevados del activador del plasminógeno, t-PA, implicaría la sobreactivación del proceso de fibrinólisis.

Con respecto a los resultados obtenidos del inhibidor del activador, PAI-1, se observa que, tras inducir la trombogénesis, se produce un aumento en ambos grupos (Figura 49C; t = 0 h vs t = 6 h). Sin embargo, este aumento es mucho menos pronunciado en los ratones *Alk1^{+/-}*. Este hecho sugiere que la deficiencia de *Alk1^{+/-}* afecta al incremento de PAI-1 tras un evento trombótico. No alcanzar los niveles fisiológicos, implica una menor inhibición, que implicaría una menor regulación del proceso de fibrinólisis, o lo que es lo mismo, un aumento de este proceso.

Finalmente, el dímero D, como uno de los principales productos de degradación del proceso de fibrinólisis, sufre un aumento que solo es significativo en el grupo de *Alk1*^{+/-} (Figura 49D; t = 0 h vs t = 24 h). Este resultado confirma que se está produciendo una mayor actividad de la fibrinólisis en los ratones *Alk1*^{+/-}.

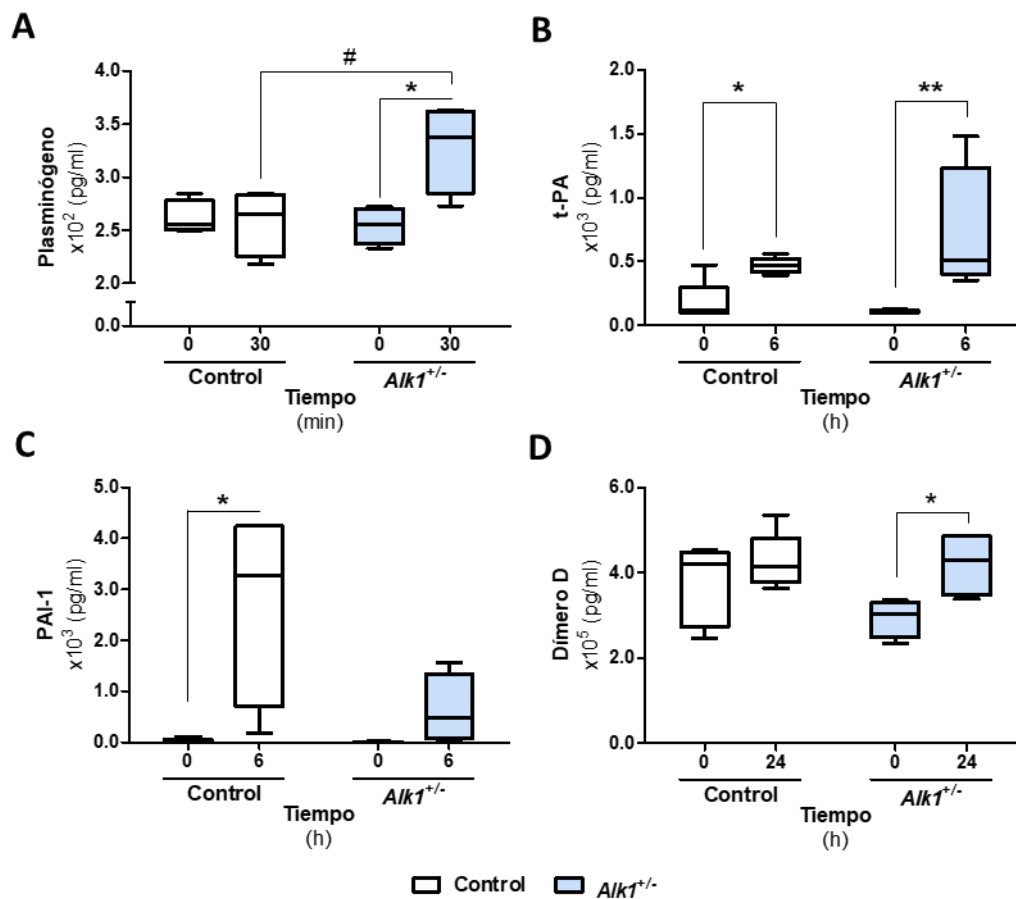


Figura 49. Análisis de la concentración plasmática de los principales componentes de la fibrinólisis en ratones *Alk1*^{+/-}. Cuantificación de la concentración de los principales componentes de la fibrinólisis: (A) Plasminógeno, (B) t-PA, (C) PAI-1 y (D) Dímero D. Se encuentran representados sus niveles basales (t = 0 min; t = 0 h) y los niveles tras un evento trombótico agudo (t = 30 min; t = 6 h; t = 6 h y t = 24 h, respectivamente). Se representa un *box plot* 10-90 percentil; Control *Alk1*^{+/+} (n = 5) y *Alk1*^{+/-} (n = 5). Test estadístico ANOVA de dos vías. (A) (*; #) p < 0,05; (**) p < 0,01.

Observando globalmente todos los resultados, en los ratones *Alk1^{+/-}*, existen mayores niveles del activador t-PA, menores niveles del inhibidor PAI-1 y mayores niveles del producto de degradación, Dímero D. Todos estos datos sugieren que la deficiencia de Alk1 implica una situación de sobreactivación del proceso de fibrinólisis que podría generar una degradación prematura del trombo recién formado.

The background is a detailed technical drawing in pencil or light grey. It features several large gears of varying sizes, some with teeth clearly defined. There are numerous construction lines, including circles, rectangles, and straight lines, some of which are dashed. Dimensions are indicated with arrows and numbers: '22.244' is written vertically on the left, '26' appears in several places, and '41.5' is written vertically on the right. The overall style is that of a mechanical or engineering sketch.

DISCUSIÓN

“Cerca de la cima siempre hay mil excusas para bajarse
y una sola razón para subir”

Ramón Portilla

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria es una enfermedad autosómica dominante, con una prevalencia de 1 entre 5 000 - 8 000 personas, por lo que está considerada como una enfermedad rara o minoritaria (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003). Hasta el momento, se han descrito mutaciones en los genes: ENG, ALK1, Smad4 y BMP9, que tienen en común que todos pertenecen a la ruta de señalización de la superfamilia de TFG- β (Govani and Shovlin, 2009). Está descrito y muy aceptado que este factor de crecimiento tiene un papel fundamental en el correcto desarrollo de la angiogénesis en el organismo (Massagué, 2006). Por esta razón, aunque la secuencia de la vía de señalización que lleva a la patogénesis se desconoce, se ha postulado y aceptado que las malformaciones vasculares típicas de la enfermedad se deben a un proceso de angiogénesis anómalo que, en consecuencia, genera unos vasos mal formados, en forma de telangiectasias y malformaciones arteriovenosas (Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015).

Además de dichas malformaciones vasculares, la otra manifestación clínica más característica, y más prevalente, de esta enfermedad son las hemorragias recurrentes (Pau, Carney and Murty, 2001). Estas hemorragias, generalmente en forma de epistaxis y sangrados gastrointestinales, tienen una frecuencia muy alta y, a menudo, son muy abundantes y difíciles de detener (Pahl, Choudhury and Kasthuri, 2016). A pesar de que es muy complejo cuantificar estos sangrados, existen otras manifestaciones clínicas derivadas de estas que muestran la gravedad de los sangrados, como es la anemia crónica, que cursa en al menos un tercio de los pacientes, y la necesidad intrínseca de recibir transfusiones de sangre periódicas de aquellos pacientes que no responden a tratamientos de suplemento de hierro (Geisthoff *et al.*, 2015).

Desde el inicio de la historia de la enfermedad, Henri J. Rendu describió esta enfermedad como una patología distinta a la hemofilia, por no deberse a deficiencias en la coagulación sanguínea (Rendu, 1896). Así, desde que se describió a la HHT como una enfermedad con entidad propia, se han tratado

de definir las causas por las que se generan esos sangrados tan abundantes. A partir del año 1965, algunos autores describieron alteraciones en los pacientes que podrían explicar la patología de la enfermedad a partir de alguna alteración molecular de la hemostasia, como por ejemplo, la disminución de la adhesión y agregación plaquetaria (Muckle, 1965; Larsson, 1974; Endo *et al.*, 1984), un aumento localizado de t-PA en los vasos telangiectásicos (Kwaan and Silverman, 1973) o síndrome de coagulación intravascular diseminada (Bick, 1981). Además, se ha descrito su posible relación con la enfermedad de von Willebrand, donde existe una disminución de la producción y liberación de este factor (Conlon *et al.*, 1978; Hanna *et al.*, 1984; Sugiura, Kawashima and Watanabe, 1991). Sin embargo, estas deficiencias funcionales nunca han llegado a ser confirmadas, de hecho, en estudios más recientes se describen parámetros de función plaquetaria totalmente normales (Steel *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2007).

La tendencia a encontrar la causa molecular que lleva a una posible alteración de la hemostasia disminuyó tras aceptarse la teoría de que estos sangrados se debían a una mayor fragilidad de los vasos. El primer grupo en describirlo fue el de Hashimoto, en 1972. No obstante, no fue hasta 2002 cuando finalmente se describió la relación entre los genes afectados en la HHT y su participación en la angiogénesis, y se admitió la alteración de la angiogénesis como etiopatogenia de los sangrados (Hashimoto and Pritzker, 1972; Rahul K Shah, Dhingra and Shapshay, 2002). Estos hechos, unidos a que los primeros ratones modelo de la enfermedad emergieron en 1999 - 2003 (Bourdeau, Dumont and Letarte, 1999; Srinivasan *et al.*, 2003), hace que los estudios realizados en animales experimentales se hayan centrado en entender mejor la patogénesis de las malformaciones vasculares, para así poder diseñar estrategias terapéuticas que mejoren la frecuencia de aparición de vasos mal formados y con ello la disminución de los sangrados.

No obstante, nuestro grupo de investigación defiende que es posible la existencia de alteraciones en el sistema de hemostasia. Ciertamente, compartimos la teoría que propone la fragilidad de las malformaciones vasculares como causa de la aparición de las hemorragias. No obstante, esta teoría solo explicaría la elevada frecuencia de sangrados, pero no lo abundantes, graves y difíciles de detener que a menudo pueden llegar a ser las hemorragias en los pacientes de HHT. A pesar de la evidente importancia que tienen los sangrados en esta enfermedad, no existen estudios previos realizados en ratones modelo de la enfermedad en los que se investigue de manera específica todo el proceso de hemostasia, hecho que justifica la importancia de realizar este trabajo.

Para la realización del estudio de la hemostasia en la HHT, hemos utilizado ratones transgénicos haploinsuficientes para el gen de endogлина (*Eng^{+/-}*) o para el gen de Alk1 (*Alk1^{+/-}*). Estos ratones heterocigotos *Eng^{+/-}* y *Alk1^{+/-}* son los modelos genéticos más cercanos de los pacientes con HHT en términos de genotipo (Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015). Se ha observado que a estos animales les aparecen manifestaciones clínicas similares a las que HHT, como por ejemplo vasos dilatados, hemorragias nasales, telangiectasias y lesiones vasculares en hígado, el lecho de las uñas, orejas, intestino y piel (Srinivasan *et al.*, 2003; Torsney *et al.*, 2003). Sin embargo, debemos destacar que la penetrancia de este fenotipo es incompleta y su frecuencia es baja, siendo mayor en los animales con fondo genético 129/Ola (Bourdeau, Dumont and Letarte, 1999; Srinivasan *et al.*, 2003). A pesar de la baja penetrancia, la genética sería equivalente a la de los pacientes de HHT, razón por la que estos ratones se han utilizado en la mayor parte de los estudios de la HHT en modelos animales (Tual-Chalot, Oh and Arthur, 2015).

1. LA DEFICIENCIA DE ENDOGLINA ALTERA LA ADHESIÓN PLAQUETA ENDOTELIO Y DEBILITA LA ESTABILIDAD DEL TROMBO

Los resultados obtenidos muestran que los ratones *Eng*^{+/-} tienen sangrados más abundantes al generar en estos una hemorragia reproducible. Comparados con su grupo control, el tiempo total de sangrado y el tiempo de resangrado es significativamente más prolongado cuando existe una haploinsuficiencia de endogлина (Figura 30 - Figura 32). Estos resultados son compatibles con la existencia de alteraciones en la hemostasia y sugieren la participación de endogлина en este proceso.

El papel imprescindible que tienen las plaquetas dentro del sistema de hemostasia ha generado que, de los pocos estudios que analizan la hemostasia en la HHT, la mayoría se centren en analizar su funcionalidad. Así, existen varios artículos que describen alteraciones en la adhesión de plaquetas por el método *in vivo* de Salzman en un total de 3 pacientes (Muckle, 1965; Larsson, 1974). Por otra parte, se describen defectos en la agregación plaquetaria en dos estudios (Endo *et al.*, 1984; Pandolfi and Ehinger, 2009). Sin embargo, todos se tratan de casos aislados de pacientes y, en general, utilizan métodos ahora obsoletos, pues en la actualidad se disponen técnicas más avanzadas y sensibles. Además, existen estudios publicados en el mismo periodo que muestran parámetros plaquetarios normales (Kwaan and Silverman, 1973; Steel *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en esta tesis para comprobar la funcionalidad de las plaquetas muestran que no hay diferencias en el número basal de plaquetas de estos ratones (Figura 34), así como tampoco hay diferencias en la activación y agregación con respecto al grupo control (Figura 35). Todo esto indicaría que la delección *Eng* no afecta ni a los niveles ni a la funcionalidad de las plaquetas. De acuerdo a lo descrito en la bibliografía, no hay estudios que relacionen *ENG*

con alteraciones en la generación o función plaquetaria, en parte porque no existen indicios de que estén asociadas.

Haciendo una visión global de estos hechos, tiene sentido que el mecanismo molecular que afecta a la hemostasia no sea una alteración de las plaquetas, puesto que, como se explicaba anteriormente, estudiar el comportamiento plaquetario en muestras de pacientes de HHT es muy accesible y fácil de realizar en los hospitales clínicos. Así, en caso de existir un problema en las plaquetas se hubiera detectado hace décadas. No obstante, con este estudio realizado en condiciones controladas, se confirma que las plaquetas de ambos modelos tienen un comportamiento similar al de sus grupos control.

De la misma manera que ocurre con la hemostasia primaria, es fácil tratar de encontrar las causas de las alteraciones de la hemostasia en defectos en la cascada de la coagulación. Sin embargo, la HHT no es una enfermedad que tenga deficiencia en alguno de los factores de la coagulación (Kritharis, Al-Samkari and Kuter, 2018). De hecho, paradójicamente, se ha postulado que existe una asociación entre niveles bajos de hierro, como consecuencia de las continuas pérdidas de sangre, y niveles altos de FVIII que podrían explicar el alto riesgo de trombosis que tienen estos pacientes (Shovlin *et al.*, 2007; J. a Livesey *et al.*, 2012; Finsterer and Sehnal, 2015). En cualquier caso, la relación entre HHT y los factores de la coagulación que participan en la hemostasia secundaria favorecen la coagulación. Por tanto, debido a que no existen en la bibliografía ningún indicio que indique la existencia de algún defecto en los factores de la coagulación, unido a que estas alteraciones son fácilmente detectables en clínica, decidimos que no estaba justificado el gasto de animales y recursos para estudiar la hemostasia secundaria en estos modelos de HHT.

En 1991, Anna Sureda concluyó que “al no encontrar parámetros hemostáticos o plaquetarios anormales, probablemente, el sangrado en la

HHT pueda estar relacionado con alteraciones en las células endoteliales que deben estudiarse localmente” (Sureda *et al.*, 1991). De hecho, hay muchos autores que de la misma manera concluyen que la mayoría de las manifestaciones clínicas de la HHT aparecen como consecuencia de alteraciones en el endotelio. No solo se refieren a este para explicar la generación de malformaciones vasculares, sino también para explicar las causas de otras alteraciones detectadas en el proceso de hemostasia. Brevemente, Hashimoto, acusa a la disminución de uniones entre las células endoteliales y a la formación de paredes vasculares más irregulares y débiles como causa de los recurrentes sangrados (Hashimoto and Pritzker, 1972). Además, también se ha descrito una asociación entre la HHT y la enfermedad de von Willebrand (Conlon *et al.*, 1978; Hanna *et al.*, 1984; Sudarshan, Natelson and Gordon, 1985), que se caracteriza por una disminución de los niveles de ristocetina, una unión no covalente entre vWF y FVIII (Bharati and Prashanth, 2011). La explicación que aportaban es que las células endoteliales podían predisponer a estos pacientes a la generación de telangiectasias que lleva a una síntesis o liberación de vWF defectuosa (Conlon *et al.*, 1978; Hanna *et al.*, 1984). Sin embargo, otros autores describieron posteriormente que esta relación no es común y que ha ocurrido en esas familias puntualmente (Steel *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 1991). De hecho, tal y como se ha explicado en el apartado anterior, estudios más actuales describen el efecto contrario en algunos pacientes de HHT (Shovlin *et al.*, 2007; J. A. Livesey *et al.*, 2012; Finsterer and Sehnal, 2015).

Así, nos planteamos que posiblemente la deficiencia genética de alguno de los dos genes pudiera afectar a la respuesta vasoconstrictora que ocurre como consecuencia del daño vascular. Algunos estudios han descrito el papel de ENG o ALK1 en el tono vascular (Kapur, Morine and Letarte, 2013), donde el endotelio tiene un papel principal en la secreción de moléculas vasoactivas (González-Núñez, Muñoz-Félix and López-Novoa, 2013). Así, mutaciones tanto en *ENG* como en *ALK1* se asocian a hipertensión pulmonar, por la

relación de estos dos genes con el receptor BMP tipo II, principal responsable de la mayoría de formas familiares de hipertensión pulmonar (Machado *et al.*, 2006), por tanto, la deficiencia de ambos genes contribuye al deterioro del tono vascular (Mahmoud *et al.*, 2009). Por estas razones, quisimos comprobar que la respuesta vasoconstrictora de los anillos de aorta, procedentes de estos ratones, no se había perdido como consecuencia de una deficiencia genética.

En nuestros experimentos con agentes vasoactivos presentes en la respuesta hemostática, observamos que, a excepción de una mayor vasoconstricción de los anillos de aorta de los ratones *Eng^{+/-}* en presencia de serotonina, no existían diferencias con respecto a sus controles (Figura 33 y 44). Nuestros resultados no contradicen lo estudiado en la bibliografía, ya que los artículos que relacionan estos genes con el tono vascular se centran en estudios de hipertensión. Se ha observado que en la hipertensión arterial pulmonar asociada a la deficiencia de ENG o ALK1 ocurre por una pérdida de la respuesta vasodilatadora dependiente de NO, un vasodilatador local (Jerkic *et al.*, 2004; Morrell, 2006). Por tanto, la pérdida de alguno de los dos genes afectaría a la vasodilatación, pero no a la respuesta frente a agentes vasoconstrictores que actúan en la hemostasia de manera aislada.

1.1. ENDOGLINA PARTICIPA EN LA ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO

Tal y como describimos en el apartado de introducción, las plaquetas tienen un gran número y variedad de integrinas. Concretamente, existe un grupo mayoritario que se caracteriza por interaccionar con el dominio RGD, que les confiere su capacidad de adhesión. Esta secuencia de aminoácidos se repite en muchas proteínas, entre las que se encuentra la endoglina (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987; Gougos and Letarte, 1990). Así, está descrito que la endoglina interacciona con células murales, pericitos o plaquetas, a través de la interacción de su dominio RGD con las integrinas

$\alpha 5\beta 1$ o $\alpha \text{IIb}\beta 3$ en diferentes situaciones fisiopatológicas: la maduración de los vasos (Rossi, Lopez-Novoa and Bernabeu, 2014; Rossi *et al.*, 2016), la trans migración leucocitaria (Rossi *et al.*, 2013) o a la adhesión de plaquetas al endotelio (Rossi *et al.*, 2018). Los estudios de interacción de endotelio y plaquetas a través de endogлина llevados a cabo por Rossi *et al.* demostraron que la ausencia total de endogлина producía una disminución de la adhesión (Rossi *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta ahora no estaba demostrado si la haploinsuficiencia de endogлина es suficiente para generar este fenotipo. Nuestros resultados demuestran que la deficiencia parcial de endogлина sí genera una menor adhesión plaquetaria y una menor resistencia al flujo *in vitro* (Figura 37). Esto se traduce en un retraso en la formación del trombo estable tras el estímulo de la carótida con cloruro férrico (Figura 38). Además, demostramos que existe una relación íntima o directa entre los niveles de endogлина y la interacción de endogлина con las integrinas de plaquetas, ya que la sobreexpresión endogлина humana aumenta la adhesión, la resistencia al flujo y, como consecuencia, la formación de un trombo más estable (Figura 40 - 41).

Todo esto nos permite proponer un modelo del efecto de la haploinsuficiencia de endogлина:

En el inicio del proceso de hemostasia se genera una monocapa de plaquetas por su interacción con el subendotelio, esta monocapa detendría el sangrado (Prevost et al., 2003). Sin embargo, son necesarias uniones secundarias para que se forme un tapón hemostático sólido y estable. Estas uniones están principalmente mediadas por las integrinas, y sin ellas, el trombo recién formado se arrastraría con el torrente circulatorio, lo que daría lugar a la aparición de nuevo del sangrado (Angelillo-Scherrer, 2004). Ante una situación de deficiencia de endogлина, como es el caso de los ratones *Eng^{+/-}*, se formaría el tapón plaquetario debido a que, tal y como se ha descrito en resultados previos, no existen alteraciones en la función plaquetaria, por tanto, las plaquetas están interaccionando correctamente

con el subendotelio y entre ellas para generar un tapón plaquetario. No obstante, la falta de endoglina implica una generación insuficiente de interacciones plaqueta-endotelio y como consecuencia, no se forma un trombo robusto y estable. Este podría ser arrancado y arrastrado por la fuerza mecánica que ejerce el torrente sanguíneo, lo que resultaría en la reaparición de la hemorragia, ver explicación del modelo en la [Figura 50 y 53](#).

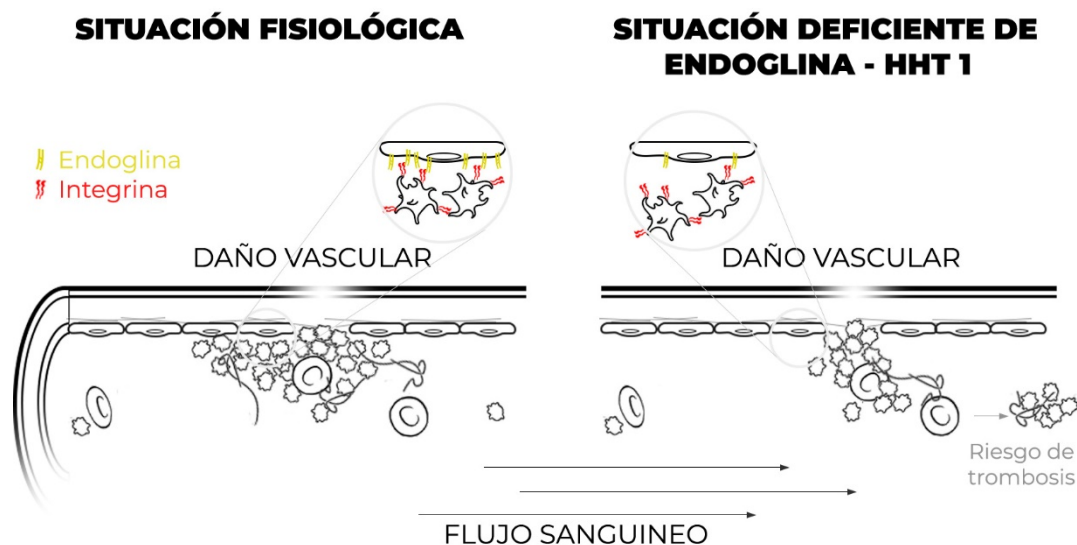


Figura 50. Esquema representativo de la adhesión de plaquetas a células endoteliales. Con niveles de endoglina normales (representado a la izquierda) donde el trombo se consolida. Y a la derecha, se representa una situación deficiente de endoglina como ocurre en la HHT donde el trombo es arrastrado por el torrente circulatorio.

1.2. EL RIESGO DE TROMBOSIS EN LA HHT COMO CONSECUENCIA DE UNA MENOR ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO

A pesar de que una de las mayores complicaciones en clínica de los pacientes de HHT es el manejo de las recurrentes hemorragias, paradójicamente, se ha descrito que aproximadamente el 6 – 7 % tienen un alto riesgo de sufrir trombosis (Shovlin, 2010; Zaffar *et al.*, 2015). En primer lugar, aquellos pacientes que tienen MAV pulmonares pueden desarrollar

apoplejía tromboembólica, como consecuencia de esta complicación. Con carácter más general, los pacientes de HHT pueden tener un estado protrombótico inherente relacionado con las alteraciones en la regulación de la coagulación en la superficie endotelial (Dittus, Streiff and Ansell, 2015). Hasta la fecha, la hipótesis más aceptada que explica el mayor riesgo de sufrir eventos trombóticos es el aumento de vWF y FVIII que presentan algunos pacientes. Como ya se ha explicado, este aumento de FVIII está asociado a niveles bajos de hierro, producidos por las continuas pérdidas de sangre. El grado de elevación de FVIII se correlaciona con el riesgo trombótico futuro (Shovlin *et al.*, 2007; Finsterer and Sehnal, 2015).

Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, pensamos que debido a que la formación del trombo es inestable, a causa de la deficiencia de endoglina, el riesgo de que sean arrastrados por el torrente sanguíneo es muy elevado. En el caso de que así ocurra, estos circularán por la red de vasos hasta que queden retenidos en algún vaso de pequeño calibre. Así, creemos que este mecanismo podría, en parte, explicar el mayor riesgo que sufren estos pacientes de tener un evento tromboembólico, ver [Figura 50](#).

2. LOS RATONES DEFICIENTES EN ALK1 PRESENTAN ALTERACIONES EN LA FIBRINOLISIS

En lo que se refiere a los experimentos realizados en los ratones heterocigotos *Alk1^{+/-}*, estos animales también tienen sangrados más prolongados que los del grupo control. De la misma manera que ocurre en los ratones *Eng^{+/-}*, estos resultados sugieren la posible existencia de alteraciones en la hemostasia de estos ratones y la posible implicación de Alk1 en este proceso.

Tal y como se explicaba anteriormente, la aparición de aberraciones en el proceso de hemostasia primaria y de hemostasia secundaria debidas a la deficiencia de Alk1 son prácticamente descartables, debido a que los

componentes de ambos procesos se pueden estudiar fácilmente en un laboratorio clínico hospitalario y nunca se han llegado a confirmar dichas alteraciones. A pesar de que algunos artículos hacen referencia a defectos en la funcionalidad plaquetaria (Kwaan and Silverman, 1973; Steel *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2007), estas alteraciones nunca han llegado a confirmarse con datos más recientes. Así, nuestros datos confirmarían la ausencia de alteraciones en la función plaquetaria (Figura 45 - 46) y nos llevan a pensar de nuevo en que el efecto puede deberse a alguna alteración en la función endotelial como regulador de la hemostasia.

El endotelio juega un papel imprescindible en la fibrinólisis, está descrito que las células endoteliales sintetizan y liberan dos de los componentes más importantes de este proceso, el t-PA y el PAI-1 (Akao *et al.*, 2003). A la vista de nuestros resultados, la haploinsuficiencia de *Alk1* parece alterar los niveles de los principales componentes de la fibrinólisis.

Poco se sabe acerca de la regulación del gen del plasminógeno (Akao *et al.*, 2003) y son inexistentes los estudios que relacionen la expresión de *Alk1* y plasminógeno, por lo que a pesar de que nuestros resultados parecen mostrar una situación en la que se asocie la deficiencia de *Alk1* con una mayor expresión de plasminógeno (Figura 49A), no podemos contrastarlo con la bibliografía.

En lo que se refiere al activador del plasminógeno (t-PA), este sufre un aumento más pronunciado y significativo en los ratones deficientes de *Alk1* con respecto a sus controles (Figura 49B). Este hecho concuerda con lo descrito en la bibliografía, donde se expone que en los ratones KO (*Alk1*^{-/-}) está aumentada la expresión de t-PA (Oh *et al.*, 2000). Con respecto a estudios realizados en pacientes de HHT, son pocos los artículos que analizan estos componentes de la fibrinólisis. Sin embargo, sí existen dos publicaciones que describen la detección de niveles altos de t-PA en las

telangiectasias de estos pacientes (Kwaan and Silverman, 1973; Watanabe, Hanawa and Morishima, 1985).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el aumento de PAI-1 en los ratones *Alk1*^{+/-} tras la trombogénesis es mucho menos pronunciado que la del grupo control (Figura 49C). Según lo descrito en la bibliografía, en ratones *Alk1*^{-/-}, la deficiencia de este gen se relaciona con una mayor expresión de PAI-1 (Oh *et al.*, 2000). La relación entre la expresión de *ALK1* y *PAI-1* está muy descrita y admitida. Son muchos los artículos que citan que las vías de TGF- β / ALK5 y TGF- β / ALK1 tienen efectos opuestos en el comportamiento de las células endoteliales, donde PAI-1 se induce específicamente a través de la vía TGF- β / ALK5, pero Id1 es específicamente un gen diana de TGF- β / ALK1 (Goumans *et al.*, 2002). Así, si el ratio ALK1 / ALK5 aumenta, a su vez, aumenta el ratio ID1 / PAI-1 (Scharpfenecker *et al.*, 2009; Pardali, Goumans and ten Dijke, 2010; Curado *et al.*, 2014). Por tanto, según estos trabajos, una menor expresión de *ALK1* llevaría a una mayor expresión de *PAI-1*. El hecho de que en nuestros resultados se refleje un menor aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 después de inducir la trombogénesis, no contradice necesariamente lo descrito en los artículos. Pensamos que el hecho de que los ratones *Alk1*^{+/-} tengan niveles de t-PA muy elevados podría enmascarar el aumento de PAI-1. Recordemos que el t-PA es inhibido por PAI-1 y que las serpinas inactivan el t-PA formando complejos con uniones covalentes que se eliminan rápidamente (Lillis *et al.*, 2008; Kaji, 2016). Así, una unidad de PAI-1 eliminaría una unidad de t-PA y, como consecuencia de un aumento muy elevado del t-PA, podría estar ocurriendo un aumento de PAI-1 que queda oculto por la degradación, ver modelo en la Figura 51.

Resultados obtenidos

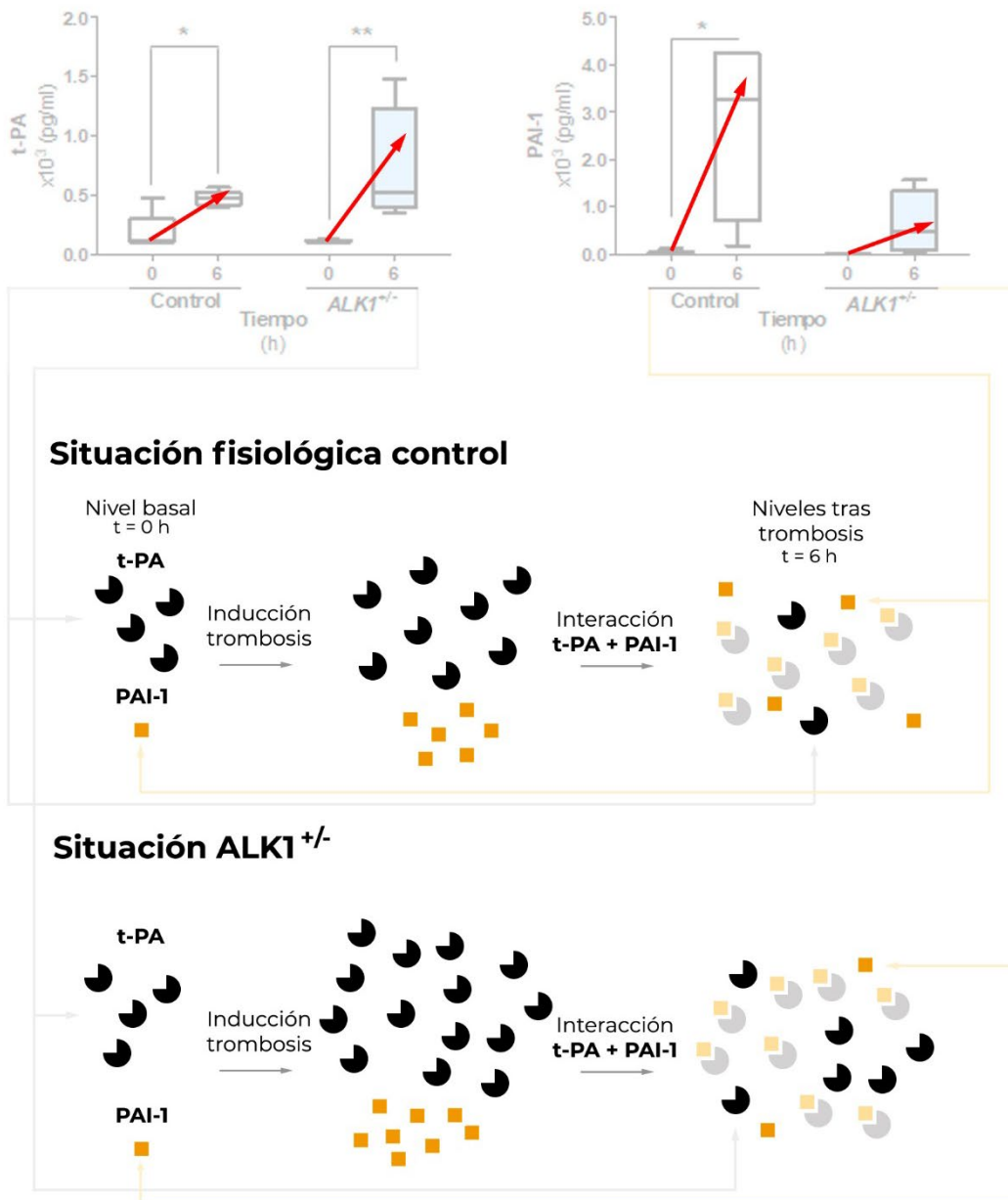


Figura 51. Esquema simplificado de la relación entre los niveles de t-PA y PAI-1 tras la inducción de la trombosis en una situación fisiológica y en los ratones heterocigotos *Alk1*^{+/-}. En la primera sección del esquema se muestran las gráficas obtenidas a partir de los resultados de los experimentos. A continuación, un modelo que explica la situación fisiológica y lo que ocurre en ausencia de *Alk1*. En niveles basales, la fibrinólisis está latente, hay pequeños niveles de t-PA y PAI-1 circulantes. Ante una situación de trombosis, la fibrinólisis se activa, aumentan los niveles de ambos componentes. En el caso de PAI-1, puede sufrir un aumento muy pronunciado, pero si existe una presencia muy abundante de t-PA se eliminará y quedará enmascarada.

Por último, nuestros resultados muestran la existencia de un incremento de dímero D tras 24 horas desde el inicio de la trombogénesis en los ratones deficientes en *Alk1* (Figura 49D). Tal y como se ha descrito anteriormente, el dímero D, un producto de la proteólisis de la fibrina reticulada generado por la plasmina, es un buen marcador para cuantificar la actividad fibrinolítica en un organismo. Así, este dato nos confirma que los ratones *Alk1*^{+/-} sufren mayor fibrinólisis.

En definitiva, la deficiencia de *Alk1* favorece el proceso de fibrinólisis. Puesto que tienen los niveles de t-PA altamente aumentados, así como de plasminógeno. A este hecho se le suma que los niveles de PAI-1 son más bajos que los del grupo control. Es decir, los niveles de PAI-1 son insuficientes para inhibir y regular la actividad de t-PA, al mismo tiempo el t-PA tiene una mayor disponibilidad de sustrato, el plasminógeno. Todas estas condiciones favorecen un estado profibrinolítico que se confirma con los niveles más elevados del dímero D (Figura 52).

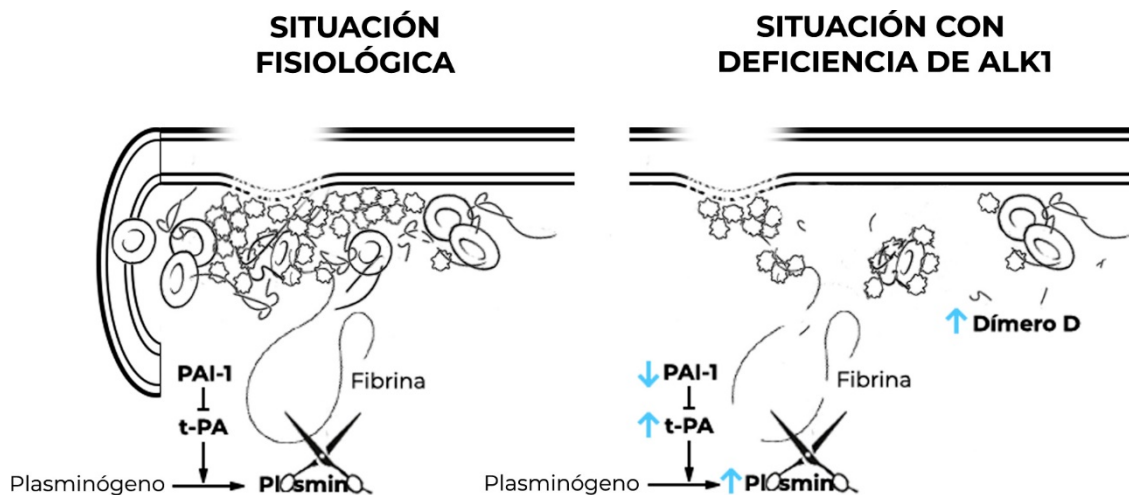


Figura 52. Esquema de la cascada de la fibrinólisis en una situación fisiológica y en ausencia de *Alk1*. En una situación fisiológica, la fibrinólisis está finamente regulada. En ausencia de *Alk1*, hay mayores niveles del activador (t-PA) y de sustrato (plasminógeno), los niveles del inhibidor son insuficientes y por tanto el proceso de fibrinólisis está muy activado, hecho que se confirma por el aumento de los niveles del producto de la fibrinólisis (Dímero D).

Esta situación podría explicar la dificultad que tienen los pacientes de HHT para detener las hemorragias. No somos los primeros que planteamos la fibrinólisis aumentada como causa de la severidad de los sangrados en la HHT. En 1973 y 1985, se detectó un aumento del activador del plasminógeno en los vasos telangiectásicos, “siendo este un factor responsable del sangrado excesivo en esta enfermedad” (Kwaan and Silverman, 1973; Watanabe, Hanawa and Morishima, 1985). Sin embargo, Steel y colaboradores no encontraron estas alteraciones en una familia con HHT, por lo que descartaron esta hipótesis (Steel *et al.*, 1988). En esta época no existía el diagnóstico genético, y si nuestra teoría es correcta, una posible explicación podría ser que estos pacientes no pertenecieran al grupo de HHT2, además la penetrancia variable de esa enfermedad puede dificultar la repetición de algunos hechos en todos los pacientes. No existen más estudios que muestren datos de algún componente de la fibrinólisis en pacientes de HHT, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados con estudios más actuales. No obstante, existe un hecho que podría sostener nuestra hipótesis, y es que, a pesar de que son muchas las diferentes terapias probadas con resultados no concluyentes, el uso de antifibrinolíticos en pacientes de HHT ha sido positivo. Se ha descrito que el tratamiento con ácido ϵ -aminocaproico y, sobre todo, con ácido tranexámico disminuye los sangrados nasales y gastrointestinales. Hecho que se refleja cuantitativamente en el aumento de los niveles de hemoglobina, y su asociada mejora de la anemia, y la disminución de la necesidad de transfusiones de sangre (Saba, Morelli and Logrono, 1994; Annichino-Bizzacchi *et al.*, 1999; Sabbà, Gallitelli and Palasciano, 2001; Chin, Rotenberg and Witterick, 2016).

El ácido tranexámico es un derivado sintético del aminoácido lisina que bloquea competitivamente los sitios de unión de lisina situados en el plasminógeno, inhibiendo así la fibrinólisis (Okamoto *et al.*, 1997). Pero además, también se ha descrito que este fármaco estimula la expresión de

ALK1 y endoglina en células endoteliales, así como la actividad de la vía ALK-1 / endoglina (Fernandez-L *et al.*, 2007). Se desconoce mecanismo por el que el TXA estimula la vía de TGF- β , sin embargo, estos autores concluyen que podría ocurrir a través de una inhibición de la activación del plasminógeno.

Así, estos autores hipotetizan sobre la existencia de una asociación entre la disminución de la activación del plasminógeno y la mayor expresión de ALK1 y endoglina y, en definitiva, TGF- β . Nuestros resultados podrían confirmar esta hipótesis, ya que se ha observado que una menor actividad de la vía de TGF- β , como consecuencia de niveles bajos de endoglina y ALK1, llevan a una mayor activación del plasminógeno. Y esta mayor activación parece ocurrir a causa de la mayor expresión de t-PA que lleva a un proceso de fibrinólisis aumentado. Si estos conceptos se trasladan a la clínica, la deficiencia de *ALK1* llevaría a la disgregación del trombo por escisión de las fibras de fibrina, imprescindibles para generar un trombo consolidado.

3. MODELO PROPUESTO

Finalmente, en esta tesis doctoral se ha expuesto que cada modelo murino muestra alteraciones que justificarían la alteración de la hemostasia por dos causas distintas. Sin embargo, nos gustaría destacar que no pensamos que sean dos alteraciones que llevan a un mismo fenotipo. Sino que se ha descrito que la expresión de *ENG* y *ALK1* están directamente relacionadas, es decir, la disminución de uno llevaría a la disminución de la expresión del otro, y al revés (Fernández *et al.*, 2005; Fernandez-Lopez *et al.*, 2007). Así, a pesar de que nuestros resultados llevan a pensar que la haploinsuficiencia de *Eng* lleva a una alteración de la hemostasia únicamente a través de una disminución de la estabilización del trombo y la haploinsuficiencia de *Alk1* a través de un proceso de fibrinólisis aumentado, ver [Figura 53](#), no podemos olvidar el hecho de que estos dos genes están relacionados. Por esta razón, se analizaron los datos globalmente, y se observó que, en efecto, lo justificado en los anteriores apartados es cierto, pero al mismo tiempo el modelo *Alk1*^{+/-} tiende a mostrar las mismas alteraciones que en los ratones *Eng*^{+/-}, y viceversa. Estos hechos se explican con más detalle a continuación:

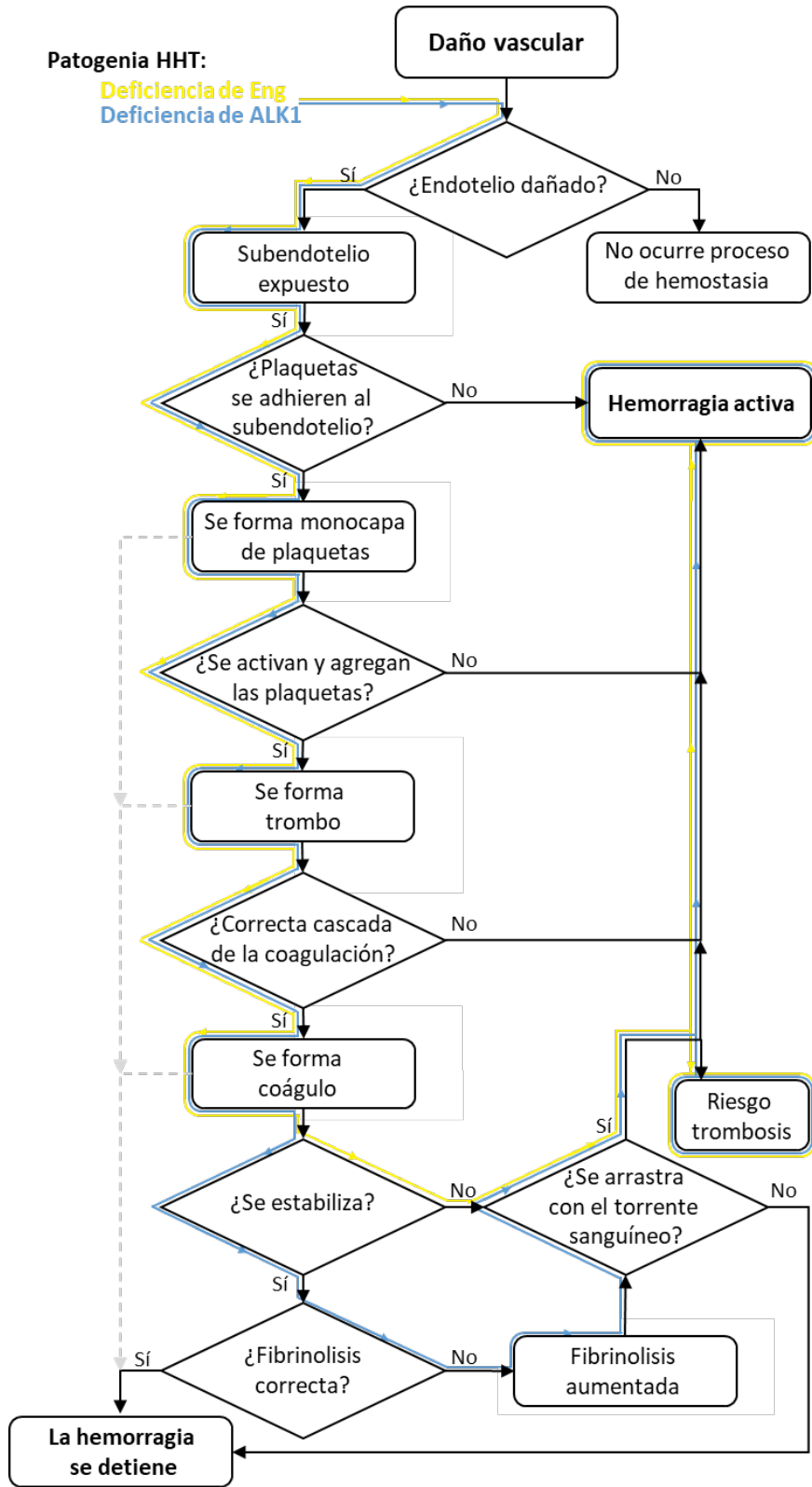


Figura 53. Esquema resumen de la patogenia de los sangrados severos en la HHT. En negro se encuentra representada una secuencia simplificada de la fisiología de la hemostasia. En amarillo y azul se representan la situación patogénica observada en los resultados obtenidos en este trabajo, en la situación de heterocigosis genética de endogлина o ALK1 respectivamente.

A. ALTERACIONES DE ESTABILIZACIÓN DEL TROMBO EN LOS RATONES *Alk1*^{+/-}

Se ha justificado que la deficiencia de endogлина genera una menor adhesión plaquetaria sobre el endotelio que afectaría a la estabilización del trombo. Si comparamos estos resultados, con lo ocurrido en los ratones *Alk1*^{+/-} se observa que, por una parte, en los experimentos *in vitro* de adhesión de plaquetas, las plaquetas tienden menos a establecer uniones sobre las células endoteliales deficientes en *Alk1*, ver [Figura 47C](#). Y, por otra parte, en los estudios *in vivo*, donde se genera una trombogénesis local inducido por FeCl₃, para estudiar la disminución del flujo como consecuencia del crecimiento del trombo que se genera sobre la pared vascular, se observa que también hay una tendencia a que los ratones *Alk1*^{+/-} tarden más en generar un trombo lo suficientemente grande y estable como para ocluir la carótida ver [Figura 48](#). Atribuimos la tendencia de ambos modelos a tener comportamientos similares a la falta de endogлина que deben sufrir los ratones *Alk1*^{+/-}. El hecho de no ser resultados estadísticamente significativos no lo consideramos como un factor excluyente. Ya que es previsible que la falta de ALK1 no genere grandes diferencias en la adhesión de plaquetas, pues ALK1 carece del dominio RGD.

Y, sin embargo, las plaquetas tienden a disminuir su adhesión al endotelio deficiente en *Alk1*, esta adhesión, según las conclusiones de este estudio, es mediada por endogлина, luego, parece haber una disminución de endogлина en las células endoteliales *Alk1*^{+/-} que favorece que haya alteraciones en la estabilización del trombo. Esta disminución de la estabilización también se ve reflejada en los resultados *in vivo*, donde los ratones *Alk1*^{+/-} tienden a tardar más en ocluir la carótida, probablemente de nuevo debido a esta disminución de la expresión de endogлина.

Cabe destacar que descartamos que este retraso en el taponamiento de la carótida se deba a una desregulación de la fibrinólisis como consecuencia de

la deficiencia de *Alk1*. Es lógico pensar que el aumento de la degradación de fibrina generaría una alteración en la generación de un trombo estable, sin embargo, tal y como se ha descrito previamente, en los resultados observados de los componentes de la fibrinólisis, ver [Figura 49](#), los niveles basales de plasminógeno, t-PA o PAI-1, no están alterados a pesar de la deficiencia de *Alk1*. Por esta razón pensamos que es probable que sea necesaria la generación de una situación proinflamatoria o proangiogénica en los ratones *Alk1^{+/-}*. En el caso de este experimento, el estado proinflamatorio podría estar inducido por el daño generado en la pared vascular. Sin embargo, este experimento finaliza tras 30 min desde la inducción de la trombogénesis local, un periodo demasiado corto como para llegar a detectar posibles modificaciones en la en la transcripción génica de los componentes de la fibrinólisis.

En resumen, de deficiencia de ALK1 parece dificultar la hemostasia a través de un proceso de fibrinólisis sobrefavorecido. Sin embargo, estos ratones muestran sutilmente los afectos de la deficiencia de endoglin.

B. ALTERACIONES DEL PROCESO DE FIBRINOLISIS EN LOS RATONES *Eng^{+/-}*

Por otra parte, como se describía previamente, los ratones *Alk1^{+/-}* tienen, tras la inducción de la trombogénesis, el sistema de la fibrinólisis favorecido para degradar la fibrina, impidiendo así la generación de un trombo robusto y estable.

Si nos referimos a los datos de los componentes de la fibrinólisis en los ratones *Eng^{+/-}*, se observa que estos ratones tienden a tener mayores niveles de t-PA, sin ser significativos ([Figura 36B](#)). Y que el aumento de los niveles de PAI-1 tras la inducción de la trombogénesis es significativamente mayor al de sus controles ([Figura 36C](#)).

No está descrito que exista una relación entre la expresión de endoglina y PAI-1 o endoglina y t-PA. Sin embargo, sí está descrita la relación de ALK1 con estos dos integrantes de la fibrinólisis, donde, por un lado, la disminución de ALK1 favorece la expresión de *PAI-1* (Curado *et al.*, 2014), y por otra parte, se describe que la deficiencia de *Alk1* induce la aparición de mayores niveles de t-PA (Oh *et al.*, 2000). Es decir, al igual que ocurría en el apartado anterior, los ratones *Eng^{+/-}* tienen alterada la hemostasia por alteraciones en la estabilización del trombo, por defectos en la unión de las plaquetas a un endotelio activo. Sin embargo, tienen una tendencia a tener un comportamiento similar al que mostraban los ratones *Alk1^{+/-}* en la fibrinólisis, es decir, estas alteraciones en los ratones *Eng^{+/-}*, es probable que se deban a la relación directa que existe entre la expresión de ambos genes.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados de este estudio confirman que la deficiencia de estos genes afecta al proceso de hemostasia y que hasta la fecha no se habían detectado por no haberse estudiado este proceso a nivel endotelial. Las pruebas realizadas siempre se han generado a partir de muestras de pacientes, lo que implica una alta variabilidad y su difícil manejo. Así, la ventaja que ha supuesto nuestro estudio es que, al realizarse en modelos animales, los experimentos son más controlados y se puede inducir la activación de los componentes celulares o una situación protrombótica. De esta manera, las muestras se recogen en condiciones agudas, lo que nos permite una detención más fácil y evidente de las posibles alteraciones de la enfermedad.

A partir de este estudio hemos ayudado a aumentar el conocimiento de la enfermedad, que esperamos pueda servir en un futuro para generar nuevas terapias. No debemos olvidar que el origen de esta enfermedad es genético, lo cual dificulta enormemente la modificación del origen génico. Debido a que hoy día las terapias génicas no están del todo desarrolladas, su

generación y utilización genera mucha controversia. Por supuesto, aumentar la expresión de endoglin o Alk1 en las células endoteliales es una tarea muy compleja. No obstante, eso no evita que no estemos un paso más cerca de obtener una terapia efectiva.

Además, consideramos que este nuevo conocimiento podría ayudar a la toma de decisiones acerca de los tratamientos aplicados a estos pacientes. Un ejemplo sería el ácido tranexámico, ahora sabemos la importancia que tiene y por qué es tan efectivo en estos pacientes. De la misma manera, este conocimiento podría ayudar a descartar otros tratamientos antihemorrágicos que nada tiene que ver su mecanismo de acción con la etiopatogenia de la enfermedad.

The background of the entire page is a detailed technical drawing in pencil or light grey. It features various mechanical components, including gears of different sizes, shafts, and rectangular parts. There are numerous dimension lines with arrows and numerical values such as '22.244', '26', '48.5', '15.5', and '22'. The drawing is a complex assembly of lines, circles, and hatching, typical of an engineering blueprint.

CONCLUSIONS

"Anytime you finish a climb,
there's always the next thing you can try."

Alex Honnold

CONCLUSIONS

From the results presented in this work, we come up to the following conclusions:

1. Haemostasis system is altered in heterozygous Eng and Alk1 mice.
2. Endoglin deficiency affects thrombus stabilization due to the lack of interactions between platelets and endothelial cells.
3. Alk1 deficiency generates an upregulation of fibrinolysis system.
4. The relationship between Eng and Alk1 expression leads a common phenotype of impaired hemostasis.

The background of the entire page is a detailed technical drawing in pencil or light grey. It features various mechanical components, including gears of different sizes, shafts, and rectangular blocks. Dashed lines represent hidden edges, and solid lines represent visible ones. Several dimensions are indicated with arrows and numbers: '22.244' is written vertically on the left side, '26' is written horizontally near the top center, and '41.5' is written vertically on the right side. The overall style is that of a precise engineering sketch.

BIBLIOGRAFIA

"We are capable of so much more
than we could ever imagine"

Tommy Caldwell

BIBLIOGRAFÍA

AAssar, O. S., Friedman, C. M. and White, R. I. (1991) 'The Natural History of Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *The Laryngoscope*, 101(9), p. 977-980. doi: 10.1288/00005537-199109000-00008.

Akao, M. *et al.* (2003) 'Cellular density regulation of plasminogen gene expression in mouse hepatocytes', *Life Sciences*. Pergamon, 72(15), pp. 1695-1704. doi: 10.1016/S0024-3205(02)02483-9.

Aleman, M. M. *et al.* (2014) 'Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis.', *Thrombosis research*. NIH Public Access, 133 Suppl 1(0 1), pp. S38-40. doi: 10.1016/j.thromres.2014.03.017.

Alt, A. *et al.* (2012) 'Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding.', *PloS one*. Edited by P. Kursula, 7(2), p. e29948. doi: 10.1371/journal.pone.0029948.

Amanzada, A. *et al.* (2010) 'A case report of a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia treated successively with thalidomide and bevacizumab.', *Case reports in oncology*. Karger Publishers, 3(3), pp. 463-70. doi: 10.1159/000323152.

Anderberg, C. *et al.* (2013) 'Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination', *The Journal of Experimental Medicine*, 210(3), pp. 563-579. doi: 10.1084/jem.20120662.

Angelillo-Scherrer, A. (2004) 'Targeting thrombus stabilization: protection against thrombosis without bleeding?', *Drug Discovery Today: Disease Models*. Elsevier, 1(3), pp. 279-287. doi: 10.1016/J.DDMOD.2004.10.005.

Annichino-Bizzacchi, J. M. *et al.* (1999) 'Hereditary hemorrhagic

telangiectasia response to aminocaproic acid treatment.', *Thrombosis research*, 96(1), pp. 73–6. doi: 10.1016/s0049-3848(99)00075-4.

Aota, S., Nomizu, M. and Yamada, K. M. (1994) 'The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function.', *The Journal of biological chemistry*, 269(40), pp. 24756–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929152> (Accessed: 2 May 2019).

Arizmendez, N. P., Rudmik, L. and Poetker, D. M. (2015) 'Intravenous bevacizumab for complications of hereditary hemorrhagic telangiectasia: a review of the literature', *International Forum of Allergy & Rhinology*, 5(11), pp. 1042–1047. doi: 10.1002/alr.21587.

Arthur, H. *et al.* (2015) 'Executive summary of the 11th HHT international scientific conference', *Angiogenesis*, 18(4), pp. 511–524. doi: 10.1007/s10456-015-9482-5.

van Asten, I., Schutgens, R. and Urbanus, R. (2018) 'Toward Flow Cytometry Based Platelet Function Diagnostics', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 44(03), pp. 197–205. doi: 10.1055/s-0038-1636901.

Attisano, L. *et al.* (1993) 'Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors.', *Cell*, 75(4), pp. 671–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242742> (Accessed: 3 May 2019).

Barnett, J. M. *et al.* (2014) 'Endoglin Promotes Angiogenesis in Cell- and Animal-Based Models of Retinal Neovascularization', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(10), p. 6490. doi: 10.1167/iovs.14-14945.

Bayrak-Toydemir, P. *et al.* (2006) 'A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7', *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140A(20), pp. 2155–2162. doi:

10.1002/ajmg.a.31450.

Begbie, M. E., Wallace, G. M. F. and Shovlin, C. L. (2003) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): a view from the 21st century.', *Postgraduate medical journal*, 79(927), pp. 18–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1742589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed: 21 April 2016).

Beger, B. *et al.* (2006) 'Expression of endoglin and the activin receptor-like kinase 1 in skin suggests a role for these receptors in normal skin function and skin tumorigenesis', *British Journal of Dermatology*, 154(2), pp. 379–382. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.07043.x.

Berg, J. N. *et al.* (1997) 'The Activin Receptor-Like Kinase 1 Gene: Genomic Structure and Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2', *The American Journal of Human Genetics*, 61(1), pp. 60–67. doi: 10.1086/513903.

Bertolino, P. *et al.* (2005) 'Transforming Growth Factor- β Signal Transduction in Angiogenesis and Vascular Disorders', *Chest*, 128(6), pp. 585S-590S. doi: 10.1378/chest.128.6_suppl.585S.

Bharati, K. P. and Prashanth, U. R. (2011) 'Von Willebrand disease: an overview.', *Indian journal of pharmaceutical sciences*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 73(1), pp. 7–16. doi: 10.4103/0250-474X.89751.

Bick, R. L. (1981) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Disseminated Intravascular coagulation: A new clinical syndrome', *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 370(1), pp. 851–854. doi: 10.1111/j.1749-6632.1981.tb29791.x.

Bledzka, K., Smyth, S. S. and Plow, E. F. (2013) 'Integrin α IIb β 3: from discovery to efficacious therapeutic target.', *Circulation research*. NIH Public Access, 112(8), pp. 1189–200. doi:

10.1161/CIRCRESAHA.112.300570.

Bode, M. F. and Mackman, N. (2015) 'Protective and pathological roles of tissue factor in the heart', *Hämostaseologie*, 35(01), pp. 37–46. doi: 10.5482/HAMO-14-09-0042.

Boral, B. M., Williams, D. J. and Boral, L. I. (2016) 'Disseminated Intravascular Coagulation', *American Journal of Clinical Pathology*. Narnia, 146(6), pp. 670–680. doi: 10.1093/ajcp/aqw195.

Bourdeau, A., Dumont, D. J. and Letarte, M. (1999) 'A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 104(10), pp. 1343–51. doi: 10.1172/JCI8088.

Brinjikji, W. *et al.* (2017) 'Prevalence and characteristics of brain arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a systematic review and meta-analysis', *Journal of Neurosurgery*, 127(2), pp. 302–310. doi: 10.3171/2016.7.JNS16847.

Burrows, F. J. *et al.* (1995) 'Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1(12), pp. 1623–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815965> (Accessed: 17 May 2019).

Cai, J. *et al.* (2012) 'BMP signaling in vascular diseases', *FEBS Letters*, 586(14), pp. 1993–2002. doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.030.

Camerer, E., Kolstø, A. B. and Prydz, H. (1996) 'Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation.', *Thrombosis research*, 81(1), pp. 1–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747518> (Accessed: 16 May 2019).

Canobbio, I., Balduini, C. and Torti, M. (2004) 'Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex', *Cellular Signalling*, 16(12), pp.

1329–1344. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.05.008.

Castellino, F. and Ploplis, V. (2005) 'Structure and function of the plasminogen/plasmin system', *Thrombosis and Haemostasis*. Schattauer GmbH, 93(04), pp. 647–654. doi: 10.1160/TH04-12-0842.

Castonguay, R. *et al.* (2011) 'Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth.', *The Journal of biological chemistry*, 286(34), pp. 30034–46. doi: 10.1074/jbc.M111.260133.

Chana-Muñoz, A. *et al.* (2019) 'Origin and diversification of the plasminogen activation system among chordates.', *BMC evolutionary biology*. BioMed Central, 19(1), p. 27. doi: 10.1186/s12862-019-1353-z.

Chapin, J. C. and Hajjar, K. A. (2015) 'Fibrinolysis and the control of blood coagulation.', *Blood reviews*. NIH Public Access, 29(1), pp. 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.

Chavan, A. *et al.* (2004) 'Hepatic artery embolization for treatment of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and symptomatic hepatic vascular malformations', *European Radiology*, 14(11), pp. 2079–2085. doi: 10.1007/s00330-004-2455-5.

Cheifetz, S. *et al.* (1992) 'Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells.', *The Journal of biological chemistry*, 267(27), pp. 19027–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326540> (Accessed: 30 April 2019).

Chen, V. M. and Hogg, P. J. (2013) 'Encryption and decryption of tissue factor', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11, pp. 277–284. doi: 10.1111/jth.12228.

Chin, C. J., Rotenberg, B. W. and Witterick, I. J. (2016) 'Epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: an evidence based review of surgical management', *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. BioMed

Central, 45(1), p. 3. doi: 10.1186/s40463-016-0116-8.

Choi, E.-J. *et al.* (2014) 'Novel Brain Arteriovenous Malformation Mouse Models for Type 1 Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *PLoS ONE*. Edited by K. Brusgaard, 9(2), p. e88511. doi: 10.1371/journal.pone.0088511.

Chung, D. W. and Fujikawa, K. (2002) 'Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13.', *Biochemistry*, 41(37), pp. 11065–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220170> (Accessed: 16 May 2019).

Chung, M. G. (2015) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia', *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, 132, pp. 185–197. doi: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00013-5.

Clark, M. *et al.* (2018) 'Nosebleeds in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Development of a patient-completed daily eDiary.', *Laryngoscope investigative otolaryngology*. Wiley-Blackwell, 3(6), pp. 439–445. doi: 10.1002/lio2.211.

Clemetson, K. J. (2017) 'The origins of major platelet receptor nomenclature', *Platelets*, 28(1), pp. 40–42. doi: 10.1080/09537104.2016.1204437.

Cole, S. G. *et al.* (2005) 'A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5.', *Journal of medical genetics*, 42(7), pp. 577–82. doi: 10.1136/jmg.2004.028712.

Collen, D. and Lijnen, H. R. (2009) 'The Tissue-Type Plasminogen Activator Story', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(8), pp. 1151–1155. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179655.

Conley, B. A. *et al.* (2004) 'Endoglin Controls Cell Migration and Composition of Focal Adhesions', *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), pp. 27440–27449. doi: 10.1074/jbc.M312561200.

Conlon, C. L. *et al.* (1978) 'Telangiectasia and von Willebrand's disease in two families.', *Annals of internal medicine*, 89(6), pp. 921–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/309746> (Accessed: 14 May 2019).

Cottin, V. *et al.* (2007) 'Pulmonary Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *Medicine*, 86(1), pp. 1–17. doi: 10.1097/MD.0b013e31802f8da1.

Curado, F. *et al.* (2014) 'ALK5 and ALK1 play antagonistic roles in transforming growth factor β -induced podosome formation in aortic endothelial cells.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 34(24), pp. 4389–403. doi: 10.1128/MCB.01026-14.

Davi, G. and Patrono, C. (2007) 'Platelet Activation and Atherothrombosis', *New England Journal of Medicine*, 357(24), pp. 2482–2494. doi: 10.1056/NEJMra071014.

David, L. *et al.* (2007) 'Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells.', *Blood*, 109(5), pp. 1953–61. doi: 10.1182/blood-2006-07-034124.

Dejana, E. *et al.* (1979) 'Bleeding time in laboratory animals. II - A comparison of different assay conditions in rats', *Thrombosis Research*. Pergamon, 15(1–2), pp. 191–197. doi: 10.1016/0049-3848(79)90064-1.

Derynck, R. (1994) 'TGF- β -receptor-mediated signaling', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends, 19(12), pp. 548–553. doi: 10.1016/0968-0004(94)90059-0.

Derynck, R. and Feng, X. H. (1997) 'TGF-beta receptor signaling.', *Biochimica et biophysica acta*, 1333(2), pp. F105-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395284> (Accessed: 22 April 2019).

Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003) 'Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.', *Nature*, 425(6958), pp. 577–84. doi: 10.1038/nature02006.

Dheyauldeen, S., Abdelnoor, M. and Bachmann-Harildstad, G. (2011) 'The Natural History of Epistaxis in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia in the Norwegian population: A Cross-sectional Study', *American Journal of Rhinology & Allergy*, 25(4), pp. 214–218. doi: 10.2500/ajra.2011.25.3616.

ten Dijke, P. *et al.* (1993) 'Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity.', *Oncogene*, 8(10), pp. 2879–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8397373> (Accessed: 23 April 2019).

ten Dijke, P. and Arthur, H. M. (2007) 'Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), pp. 857–869. doi: 10.1038/nrm2262.

DiMinno, G. and Silver, M. J. (1983) 'Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 225(1), pp. 57–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6834277> (Accessed: 14 March 2019).

Dittus, C., Streiff, M. and Ansell, J. (2015) 'Bleeding and clotting in hereditary hemorrhagic telangiectasia', *World Journal of Clinical Cases: WJCC*. Baishideng Publishing Group Inc, 3(4), p. 330. doi: 10.12998/WJCC.V3.I4.330.

Donaldson, J. W. *et al.* (2015) 'Complications and mortality in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A population-based study.', *Neurology*, 84(18), pp. 1886–93. doi: 10.1212/WNL.0000000000001538.

Drake, T. A., Morrissey, J. H. and Edgington, T. S. (1989) 'Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis.', *The American journal of*

pathology, 134(5), pp. 1087–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2719077> (Accessed: 16 May 2019).

Dubois, C. *et al.* (2007) 'Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 117(4), pp. 953–60. doi: 10.1172/JCI30537.

Eckly, A. *et al.* (2011) 'Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 9(4), pp. 779–789. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x.

Endo, Y. *et al.* (1984) 'Reduced platelet aggregation induced by epinephrine and idiopathic thrombocytopenic purpura in hereditary haemorrhagic teleangiectasia.', *Thrombosis and haemostasis*, 52(3), p. 369. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6543406> (Accessed: 4 May 2019).

Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G', *Immunochemistry*. Pergamon, 8(9), pp. 871–874. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.

Esmon, C. T. and Esmon, N. L. (2011) 'The Link Between Vascular Features and Thrombosis', *Annual Review of Physiology*, 73(1), pp. 503–514. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142300.

Evrard, S. M. *et al.* (2012) 'The profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(4), pp. 670–679. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04644.x.

Farndale, R. W. *et al.* (2007) 'Platelet receptor recognition and cross-talk in collagen-induced activation of platelets', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, pp. 220–229. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02521.x.

Faughnan, M. E. *et al.* (2011) 'International guidelines for the diagnosis

and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia', *Journal of Medical Genetics*, 48(2), pp. 73–87. doi: 10.1136/jmg.2009.069013.

Fernandez-L, A. *et al.* (2007) 'Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): regulation of ALK-1/endothelin pathway in endothelial cells.', *Thrombosis and haemostasis*, 97(2), pp. 254–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264955> (Accessed: 24 May 2019).

Fernandez-Lopez, A. *et al.* (2007) 'Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia', *Human Molecular Genetics*, 16(13), pp. 1515–1533. doi: 10.1093/hmg/ddm069.

Fernández, A. *et al.* (2005) 'Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions', *Cardiovascular Research*, 68(2), pp. 235–248. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.06.009.

Finnson, K. W. *et al.* (2008) 'ALK1 Opposes ALK5/Smad3 Signaling and Expression of Extracellular Matrix Components in Human Chondrocytes', *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), pp. 896–906. doi: 10.1359/jbmr.080209.

Finsterer, J. and Sehna, E. (2015) 'Hypercoagulability in hereditary hemorrhagic telangiectasia with epilepsy.', *Journal of neurosciences in rural practice*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 6(3), pp. 407–9. doi: 10.4103/0976-3147.158791.

Fleck, R. A. *et al.* (1990) 'Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody.', *Thrombosis research*, 59(2), pp. 421–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2237820> (Accessed: 16 May 2019).

Flieger, D., Hainke, S. and Fischbach, W. (2006) 'Dramatic improvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia after treatment with the vascular

endothelial growth factor (VEGF) antagonist bevacizumab', *Annals of Hematology*, 85(9), pp. 631–632. doi: 10.1007/s00277-006-0147-8.

Gaillard, S. *et al.* (2014) 'Tranexamic acid for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients: a European cross-over controlled trial in a rare disease', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(9), pp. 1494–1502. doi: 10.1111/jth.12654.

Garcia-Tsao, G. *et al.* (2000) 'Liver Disease in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *New England Journal of Medicine*, 343(13), pp. 931–936. doi: 10.1056/NEJM200009283431305.

Garcia-Tsao, G. (2007) 'Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)', *Journal of Hepatology*, 46(3), pp. 499–507. doi: 10.1016/j.jhep.2006.12.008.

Garg, N. *et al.* (2014) 'Optimal management of hereditary hemorrhagic telangiectasia', *Journal of Blood Medicine*. Dove Press, 5, p. 191. doi: 10.2147/JBM.S45295.

Garrido-Martin, E. M. *et al.* (2014) 'Common and Distinctive Pathogenetic Features of Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 1 and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 2 Animal Models—Brief Report', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(10), pp. 2232–2236. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303984.

Geczy, C. L. (1994) 'Cellular mechanisms for the activation of blood coagulation.', *International review of cytology*, 152, pp. 49–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8206706> (Accessed: 16 May 2019).

Geisthoff, U. W. *et al.* (2015) 'How to manage patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia', *British Journal of Haematology*, 171(4), pp. 443–452. doi: 10.1111/bjh.13606.

Ginsberg, M. H. (2014) 'Integrin activation.', *BMB reports*. Korean

Society for Biochemistry and Molecular Biology, 47(12), pp. 655–9. doi: 10.5483/BMBREP.2014.47.12.241.

Gonzalez-Nunez, M. *et al.* (2015) 'Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased arterial pressure in mice', *Disease Models & Mechanisms*, 8(11), pp. 1427–1439. doi: 10.1242/dmm.019695.

González-Núñez, M., Muñoz-Félix, J. M. and López-Novoa, J. M. (2013) 'The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy?', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1832(10), pp. 1492–1510. doi: 10.1016/J.BBADIS.2013.05.016.

Gossage, J. R. and Kanj, G. (1998) 'Pulmonary Arteriovenous Malformations', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(2), pp. 643–661. doi: 10.1164/ajrccm.158.2.9711041.

Gougos, A. *et al.* (1992) 'Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts.', *International immunology*, 4(1), pp. 83–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371694> (Accessed: 2 May 2019).

Gougos, A. and Letarte, M. (1988) 'Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(6), pp. 1925–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262644> (Accessed: 22 April 2019).

Gougos, A. and Letarte, M. (1990) 'Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.', *The Journal of biological chemistry*, 265(15), pp. 8361–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692830> (Accessed: 30 April 2019).

Goumans, M.-J. *et al.* (2002) 'Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.', *The EMBO journal*, 21(7), pp. 1743–53. doi: 10.1093/emboj/21.7.1743.

Goumans, M.-J., Lebrin, F. and Valdimarsdottir, G. (2003) 'Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways.', *Trends in cardiovascular medicine*, 13(7), pp. 301–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522471> (Accessed: 30 April 2019).

Govani, F. S. and Shovlin, C. L. (2009) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review.', *European journal of human genetics: EJHG*. Nature Publishing Group, 17(7), pp. 860–71. doi: 10.1038/ejhg.2009.35.

Govani, F. S. and Shovlin, C. L. (2010) 'Fine mapping of the hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT)3 locus on chromosome 5 excludes VE-Cadherin-2, Sprouty4 and other interval genes.', *Journal of angiogenesis research*, 2, p. 15. doi: 10.1186/2040-2384-2-15.

Graulich, W. *et al.* (1999) 'Cell type specificity of the human endoglin promoter.', *Gene*, 227(1), pp. 55–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931433> (Accessed: 22 April 2019).

Greben, C. R. *et al.* (2013) 'Pulmonary Arteriovenous Malformation Embolization: How We Do It', *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, 16(1), pp. 39–44. doi: 10.1053/j.tvir.2013.01.005.

Guerrero-Esteo, M. *et al.* (2002) 'Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth Factor- β Receptors I and II', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 29197–29209. doi: 10.1074/jbc.M111991200.

de Gussem, E. M. *et al.* (2009) 'The effect of N-acetylcysteine on epistaxis and quality of life in patients with HHT: a pilot study.', *Rhinology*, 47(1),

pp. 85–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19382502> (Accessed: 23 May 2019).

de Gussem, E. M. *et al.* (2016) 'Life expectancy of parents with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia', *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central, 11(1), p. 46. doi: 10.1186/s13023-016-0427-x.

Guttmacher, A., Marchuk, A. and White, R. (1995) *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*. Available at: https://curehht.org/wp-content/uploads/2017/11/Original-HHT-Article_New-England-Journal-of-Medicine-1995.pdf (Accessed: 31 March 2019).

Hanes, F. (1909) 'Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia)', *Bull Johns Hopkins Hosp*, 20, pp. 63–73. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10005608808/> (Accessed: 7 April 2019).

Hanna, W. *et al.* (1984) 'A study of a Caucasian family with variant von Willebrand's disease in association with vascular telangiectasia and haemoglobinopathy.', *Thrombosis and haemostasis*, 51(2), pp. 275–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6429886> (Accessed: 14 May 2019).

Harvey, R. J., Kanagalingam, J. and Lund, V. J. (2008) 'The Impact of Septodermoplasty and Potassium-Titanyl-Phosphate (KTP) Laser Therapy in the Treatment of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-Related Epistaxis', *American Journal of Rhinology*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 22(2), pp. 182–187. doi: 10.2500/ajr.2008.22.3145.

Hashimoto, K. and Pritzker, M. S. (1972) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia. An electron microscopic study.', *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 34(5), pp. 751–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4507443> (Accessed: 14 May 2019).

Hiller, E. (2007) 'Basic Principles of Hemostasis', in *Modern Hematology*.

Totowa, NJ: Humana Press, pp. 327–345. doi: 10.1007/978-1-59745-149-9_19.

van Hinsbergh, V. W. M. (2001) 'The endothelium: vascular control of haemostasis', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Elsevier, 95(2), pp. 198–201. doi: 10.1016/S0301-2115(00)00490-5.

Hinsbergh, V. W. M. van (2012) 'Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation', *Seminars in Immunopathology*. Springer, 34(1), p. 93. doi: 10.1007/S00281-011-0285-5.

Hoag, J. B. *et al.* (2010) 'An epistaxis severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia', *The Laryngoscope*, 120(4), pp. 838–843. doi: 10.1002/lary.20818.

Holderfield, M. T. and Hughes, C. C. W. (2008) 'Crosstalk Between Vascular Endothelial Growth Factor, Notch, and Transforming Growth Factor- β in Vascular Morphogenesis', *Circulation Research*, 102(6), pp. 637–652. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.167171.

Huang, F. and Chen, Y.-G. (2012) 'Regulation of TGF- β receptor activity.', *Cell & bioscience*. BioMed Central, 2, p. 9. doi: 10.1186/2045-3701-2-9.

Huizinga, E. G. *et al.* (2002) 'Structures of Glycoprotein Iba1 and Its Complex with von Willebrand Factor A1 Domain', *Science*, 297(5584), pp. 1176–1179. doi: 10.1126/science.107355.

Humphries, J. D., Byron, A. and Humphries, M. J. (2006) 'Integrin ligands at a glance', *Journal of Cell Science*, 119(19), pp. 3901–3903. doi: 10.1242/jcs.03098.

Huse, M. *et al.* (2001) 'The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch.', *Molecular cell*, 8(3), pp. 671–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583628> (Accessed: 30

April 2019).

Hussain, A. *et al.* (2017) 'The differential effects of systemic vasoconstrictors on human pulmonary artery tension†', *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. Narnia, 51(5), pp. 880–886. doi: 10.1093/ejcts/ezw410.

Hussain, S. (1976) 'Disorders of hemostasis and thrombosis in the aged.', *The Medical clinics of North America*, 60(6), pp. 1273–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790050> (Accessed: 13 May 2019).

Hynes, R. O. (1992) 'Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.', *Cell*, 69(1), pp. 11–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555235> (Accessed: 2 May 2019).

Ingrand, I. *et al.* (2011) 'Altered quality of life in Rendu-Osler-Weber disease related to recurrent epistaxis.', *Rhinology*, 49(2), pp. 155–62. doi: 10.4193/Rhino09.138.

Inoue, O., Suzuki-Inoue, K. and Ozaki, Y. (2008) 'Redundant Mechanism of Platelet Adhesion to Laminin and Collagen under Flow', *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), pp. 16279–16282. doi: 10.1074/jbc.C700241200.

Jackson, S. B. *et al.* (2017) 'Gastrointestinal Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT): A Systematic Review of the Literature.', *Digestive diseases and sciences*. NIH Public Access, 62(10), pp. 2623–2630. doi: 10.1007/s10620-017-4719-3.

Jackson, S. P., Mistry, N. and Yuan, Y. (2000) 'Platelets and the injured vessel wall-- "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton.', *Trends in cardiovascular medicine*, 10(5), pp. 192–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282294> (Accessed: 16 May 2019).

Jackson, S. P., Nesbitt, W. S. and Kulkarni, S. (2003) 'Signaling events

underlying thrombus formation.’, *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 1(7), pp. 1602–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871297> (Accessed: 16 May 2019).

Janeway, C. (2001) *Immunobiology 5: the immune system in health and disease*. Garland Pub.

Jerkic, M. *et al.* (2004) ‘Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation’, *The FASEB Journal*, 18(3), pp. 609–611. doi: 10.1096/fj.03-0197fje.

Jerkic, M. *et al.* (2006) ‘Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice.’, *Cardiovascular research*, 69(4), pp. 845–54. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.020.

Johnson, D. W. *et al.* (1995) ‘A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12.’, *Genome research*, 5(1), pp. 21–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717052> (Accessed: 21 April 2019).

Johnson, D. W. *et al.* (1996) ‘Mutations in the activin receptor–like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2’, *Nature Genetics*, 13(2), pp. 189–195. doi: 10.1038/ng0696-189.

Jurk, K. *et al.* (2003) ‘Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor’, *The FASEB Journal*, 17(11), pp. 1490–1492. doi: 10.1096/fj.02-0830fje.

Kaji, H. (2016) ‘Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation’, in *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1873–1896. doi: 10.1002/cphy.c160004.

Kamath, N. *et al.* (2015) ‘Hereditary hemorrhagic telangiectasia.’, *North American journal of medical sciences*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 7(3), pp. 125–8. doi: 10.4103/1947-2714.153928.

Kapp, T. G. *et al.* (2013) 'Integrin modulators: a patent review', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor & Francis, 23(10), pp. 1273–1295. doi: 10.1517/13543776.2013.818133.

Kapur, N. K., Morine, K. J. and Letarte, M. (2013) 'Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health.', *Vascular health and risk management*. Dove Press, 9, pp. 195–206. doi: 10.2147/VHRM.S29144.

Khalafallah, A. *et al.* (2014) 'Evaluation of the Innovance d -Dimer Assay for the Diagnosis of Disseminated Intravascular Coagulopathy in Different Clinical Settings', *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 20(1), pp. 91–97. doi: 10.1177/1076029612454936.

Kiyeng, J. C. *et al.* (2016) 'Definite hereditary hemorrhagic telangiectasia in a 60-year-old black Kenyan woman: a case report', *Journal of Medical Case Reports*. BioMed Central, 10(1), p. 126. doi: 10.1186/s13256-016-0909-4.

Kjeldsen, A. D. and Kjeldsen, J. (2000) 'Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia', *The American Journal of Gastroenterology*, 95(2), pp. 415–418. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01792.x.

Kjeldsen, A. D., Vase, P. and Green, A. (1999) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients.', *Journal of internal medicine*, 245(1), pp. 31–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10095814> (Accessed: 21 April 2016).

Klapholz, B. and Brown, N. H. (2017) 'Talin - the master of integrin adhesions.', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 130(15), pp. 2435–2446. doi: 10.1242/jcs.190991.

Koleva, R. I. *et al.* (2006) 'Endoglin Structure and Function', *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), pp. 25110–25123. doi:

10.1074/jbc.M601288200.

König, H.-G. *et al.* (2005) 'TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons', *The Journal of Cell Biology*, 168(7), pp. 1077–1086. doi: 10.1083/jcb.200407027.

Kritharis, A., Al-Samkari, H. and Kuter, D. J. (2018) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia: diagnosis and management from the hematologist's perspective.', *Haematologica*. *Haematologica*, 103(9), pp. 1433–1443. doi: 10.3324/haematol.2018.193003.

Kühnel, T. *et al.* (2018) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *Otolaryngologic Clinics of North America*. Elsevier, 51(1), pp. 237–254. doi: 10.1016/J.OTC.2017.09.017.

Kwaan, H. C. and Silverman, S. (1973) 'Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *Archives of dermatology*, 107(4), pp. 571–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4697687> (Accessed: 13 May 2019).

Larsson, S. O. (1974) 'Osler's disease with impaired adhesion and aggregation of platelets', *Acta Medica Scandinavica*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 196(1–6), pp. 133–136. doi: 10.1111/j.0954-6820.1974.tb00982.x.

Lasne, D., Jude, B. and Susen, S. (2006) 'From normal to pathological hemostasis', *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*. Springer-Verlag, 53(S2), pp. S2–S11. doi: 10.1007/BF03022247.

Lastres, P. *et al.* (1994) 'Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor- β -binding protein endoglin', *Biochemical Journal*, 301(3), pp. 765–768. doi: 10.1042/bj3010765.

Latallo, Z. S. *et al.* (1962) 'Inhibition of fibrin polymerization by fibrinogen proteolysis products', *American Journal of Physiology-Legacy Content*. American Physiological Society, 202(4), pp. 681–686. doi:

10.1152/ajplegacy.1962.202.4.681.

Lebrin, F. *et al.* (2005) 'TGF- β receptor function in the endothelium', *Cardiovascular Research*, 65(3), pp. 599–608. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.10.036.

Lee, H. E. *et al.* (2009) 'A case of hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *Annals of dermatology*. Korean Dermatological Association, 21(2), pp. 206–8. doi: 10.5021/ad.2009.21.2.206.

Lillis, A. P. *et al.* (2008) 'LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies.', *Physiological reviews*. NIH Public Access, 88(3), pp. 887–918. doi: 10.1152/physrev.00033.2007.

Liu, C. *et al.* (2009) 'TACE-Mediated Ectodomain Shedding of the Type I TGF- β Receptor Downregulates TGF- β Signaling', *Molecular Cell*, 35(1), pp. 26–36. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.018.

Livesey, J. A. *et al.* (2012) 'Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia', *Thorax*, 67(4), pp. 328–333. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201076.

Livesey, J. a *et al.* (2012) 'Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia.', *Thorax*, 67(4), pp. 328–33. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201076.

Llorca, O. *et al.* (2007) 'Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *Journal of molecular biology*, 365(3), pp. 694–705. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.015.

Loaëc, M. *et al.* (2011) 'Psychosocial quality of life in hereditary haemorrhagic telangiectasia patients.', *Rhinology*, 49(2), pp. 164–7. doi: 10.4193/Rhino10.090.

López-Casillas, F. *et al.* (1994) 'Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 124(4), pp. 557–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106553> (Accessed: 30 April 2019).

Lum, L., Reid, M. S. and Blobel, C. P. (1998) 'Intracellular Maturation of the Mouse Metalloprotease Disintegrin MDC15', *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), pp. 26236–26247. doi: 10.1074/jbc.273.40.26236.

Lund, V. J. and Howard, D. J. (1997) 'Closure of the nasal cavities in the treatment of refractory hereditary haemorrhagic telangiectasia', *The Journal of Laryngology & Otology*. Cambridge University Press, 111(1), pp. 30–33. doi: 10.1017/S0022215100136369.

Lund, V. J. and Howard, D. J. (1999) 'A treatment algorithm for the management of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *American journal of rhinology*, 13(4), pp. 319–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485021> (Accessed: 23 May 2019).

Ma, J. *et al.* (2006) 'MCP-1 mediates TGF- induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration', *Blood*, 109(3), pp. 987–994. doi: 10.1182/blood-2006-07-036400.

Machado, R. D. *et al.* (2006) 'Mutations of the TGF- β type II receptorBMP2 in pulmonary arterial hypertension', *Human Mutation*, 27(2), pp. 121–132. doi: 10.1002/humu.20285.

Mackman, N. (2009) 'The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis', *Anesthesia & Analgesia*, 108(5), pp. 1447–1452. doi: 10.1213/ane.0b013e31819bceb1.

Maher, C. O. *et al.* (2001) 'Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *Stroke*, 32(4), pp. 877–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283386> (Accessed: 5 April 2019).

Mahlawat, P. *et al.* (2012) 'Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties.', *Biochemistry*. NIH Public Access, 51(32), pp. 6328–41. doi: 10.1021/bi300942x.

Mahmoud, M. *et al.* (2009) 'Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH', *Laboratory Investigation*, 89(1), pp. 15–25. doi: 10.1038/labinvest.2008.112.

Mahmoud, M. *et al.* (2010) 'Pathogenesis of Arteriovenous Malformations in the Absence of Endoglin', *Circulation Research*, 106(8), pp. 1425–1433. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211037.

Mancini, M. L. *et al.* (2007) 'Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells', *Developmental Biology*, 308(2), pp. 520–533. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.06.009.

Mann, K. G. *et al.* (2007) 'Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 5(10), pp. 2055–2061. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02710.x.

Massagué, J. (1998) 'TGF- β signal transduction', *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), pp. 753–791. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

Massagué, J. (2006) *The logic of TGF β signaling*. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0014579306004686/1-s2.0-S0014579306004686-main.pdf?_tid=7d656d04-c414-11e5-8b96-00000aacb362&acdnat=1453802978_ce71a937649b6fce72f11f7a0e2cc77

8 (Accessed: 26 January 2016).

Massague, J. and Wotton, D. (2000) 'Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system', *The EMBO Journal*, 19(8), pp. 1745–1754. doi: 10.1093/emboj/19.8.1745.

Maurer, L. M., Tomasini-Johansson, B. R. and Mosher, D. F. (2010) 'Emerging roles of fibronectin in thrombosis', *Thrombosis Research*, 125(4), pp. 287–291. doi: 10.1016/j.thromres.2009.12.017.

Maynard, J. R. *et al.* (1977) 'Tissue-factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts.', *Blood*, 50(3), pp. 387–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/884317> (Accessed: 16 May 2019).

McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P. and Pyeritz, R. E. (2011) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia: An overview of diagnosis, management, and pathogenesis', *Genetics in Medicine*, 13(7), pp. 607–616. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182136d32.

McDonald, M. T. *et al.* (1994) 'A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33–34', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 6(2), pp. 197–204. doi: 10.1038/ng0294-197.

Merlo, C. A. *et al.* (2014) 'The effects of epistaxis on health-related quality of life in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia', *International Forum of Allergy & Rhinology*, 4(11), pp. 921–925. doi: 10.1002/alr.21374.

Miyazawa, B. *et al.* (2019) 'Regulation of Endothelial Cell Permeability by Platelet-Derived Extracellular Vesicles', *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, p. 1. doi: 10.1097/TA.0000000000002230.

Miyazawa, K. *et al.* (2002) 'Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling.', *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(12), pp. 1191–204. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485160> (Accessed: 22 April 2019).

Monroe, D. M. and Hoffman, M. (2006) 'What Does It Take to Make the Perfect Clot?', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 26(1), pp. 41–48. doi: 10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83.

Morrell, N. W. (2006) 'Pulmonary Hypertension Due to BMPR2 Mutation: A New Paradigm for Tissue Remodeling?', *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(8), pp. 680–686. doi: 10.1513/pats.200605-118SF.

Mosnier, L. O. *et al.* (2001) 'The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration.', *Thrombosis and haemostasis*, 86(4), pp. 1035–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686321> (Accessed: 26 May 2019).

Muckle, T. (1965) 'Low in-vivo adhesive-platelet count in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia', *The Lancet*, 285(7377), p. 169. doi: 10.1016/S0140-6736(65)91133-5.

Muenzner, P. *et al.* (2010) 'Human-Restricted Bacterial Pathogens Block Shedding of Epithelial Cells by Stimulating Integrin Activation', *Science*, 329(5996), pp. 1197–1201. doi: 10.1126/science.1190892.

Mulloy, B. *et al.* (2016) 'Pharmacology of Heparin and Related Drugs.', *Pharmacological reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 68(1), pp. 76–141. doi: 10.1124/pr.115.011247.

Munnix, I. C. A. *et al.* (2007) 'Segregation of Platelet Aggregatory and Procoagulant Microdomains in Thrombus Formation', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(11), pp. 2484–2490. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151100.

Munoz-Chapuli, R. (2011) 'Evolution of angiogenesis', *The International Journal of Developmental Biology*, 55(4–5), pp. 345–351. doi: 10.1387/ijdb.103212rm.

Nergiz-Unal, R. *et al.* (2011) 'Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low-density lipoprotein', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(9), pp. 1835–1846. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04416.x.

Ni, H. *et al.* (2003) 'Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin IIb 3 engagement of the fibrinogen chain', *Blood*, 102(10), pp. 3609–3614. doi: 10.1182/blood-2003-03-0850.

Nurden, A. and Nurden, P. (2011) 'Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, pp. 76–91. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04274.x.

Oh, S. P. *et al.* (2000) 'Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(6), pp. 2626–31. doi: 10.1073/pnas.97.6.2626.

Okamoto, S. *et al.* (1997) 'Enzyme-Controlling Medicines: Introduction', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 23(06), pp. 493–501. doi: 10.1055/s-2007-996127.

Oshima, M., Oshima, H. and Taketo, M. M. (1996) 'TGF- β Receptor Type II Deficiency Results in Defects of Yolk Sac Hematopoiesis and Vasculogenesis', *Developmental Biology*, 179(1), pp. 297–302. doi: 10.1006/dbio.1996.0259.

Osler, W. (1901) 'On a family form of recurring epistaxis associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membrane', *Bull Johns Hopkins Hosp*, 12, pp. 333–337. Available at:

<https://ci.nii.ac.jp/naid/10007713401/> (Accessed: 7 April 2019).

Oujo, B. *et al.* (2014) 'L-Endoglin overexpression increases renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction.', *PloS one*. Public Library of Science, 9(10), p. e110365. doi: 10.1371/journal.pone.0110365.

Pahl, K., Choudhury, A. and Kasthuri, R. S. (2016) 'Causes and Severity of Anemia in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *Blood*, 128(22). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/3776?sso-checked=true> (Accessed: 26 May 2019).

Palta, S., Saroa, R. and Palta, A. (2014) 'Overview of the coagulation system.', *Indian journal of anaesthesia*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 58(5), pp. 515–23. doi: 10.4103/0019-5049.144643.

Pan, C. C. *et al.* (2014) 'Src-mediated Post-translational Regulation of Endoglin Stability and Function Is Critical for Angiogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), pp. 25486–25496. doi: 10.1074/jbc.M114.578609.

Pandolfi, M. and Ehinger, B. (2009) 'Conjunctival bleeding in Osler's disease with associated platelet dysfunction: A case report', *Acta Ophthalmologica*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 56(1), pp. 75–82. doi: 10.1111/j.1755-3768.1978.tb00469.x.

Parambil, J. G. (2016) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *Clinics in Chest Medicine*, 37(3), pp. 513–521. doi: 10.1016/j.ccm.2016.04.013.

Pardali, E., Goumans, M.-J. and ten Dijke, P. (2010) 'Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease', *Trends in Cell Biology*, 20(9), pp. 556–567. doi: 10.1016/j.tcb.2010.06.006.

Paredes, N. and Chan, A. K. C. (2013) 'The Role of the Vessel Wall', in: Humana Press, Totowa, NJ, pp. 31–46. doi: 10.1007/978-1-62703-339-8_3.

Park, J. H. *et al.* (2013) 'Nuclear expression of Smad proteins and its

prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma', *Human Pathology*, 44(10), pp. 2047–2054. doi: 10.1016/j.humpath.2013.03.009.

Park, S. O. *et al.* (2009) 'Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia', *Journal of Clinical Investigation*, 119(11), pp. 3487–96. doi: 10.1172/JCI39482.

Pau, H., Carney, A. S. and Murty, G. E. (2001) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): otorhinolaryngological manifestations.', *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 26(2), pp. 93–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309047> (Accessed: 7 April 2019).

Pearson, J. D. (1999) 'Endothelial cell function and thrombosis.', *Bailliere's best practice & research. Clinical haematology*, 12(3), pp. 329–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856973> (Accessed: 16 May 2019).

Peery, W. H. (1987) 'Clinical spectrum of hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease).', *The American journal of medicine*, 82(5), pp. 989–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3555068> (Accessed: 4 May 2019).

Pepper, M. S. (1997) 'Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.', *Cytokine & growth factor reviews*, 8(1), pp. 21–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174661> (Accessed: 3 May 2019).

Peshavariya, H. M. *et al.* (2014) 'Transforming growth factor- β 1 requires NADPH oxidase 4 for angiogenesis *in vitro* and *in vivo*', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(6), pp. 1172–1183. doi: 10.1111/jcmm.12263.

Peterson, J. (2017) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Management.', *Radiologic technology*, 88(3), pp. 277–294. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298578> (Accessed: 9 April 2019).

Petrovan, R. J. and Ruf, W. (2001) 'Residue Met¹⁵⁶ Contributes to the Labile Enzyme Conformation of Coagulation Factor VIIa', *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp. 6616–6620. doi: 10.1074/jbc.M004726200.

Plauchu, H. *et al.* (1989) 'Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population', *American Journal of Medical Genetics*, 32(3), pp. 291–297. doi: 10.1002/ajmg.1320320302.

Proctor, D. D. *et al.* (2008) 'Hormonal Therapy for the Treatment of Gastrointestinal Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42(6), pp. 756–757. doi: 10.1097/MCG.0b013e318032391f.

Rauch, A. and Paris, C. (2018) 'Hemostasia primaria', *EMC - Tratado de Medicina*. Elsevier Masson, 22(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/S1636-5410(17)87866-1.

Ray, B. N. *et al.* (2010) 'ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration', *Carcinogenesis*, 31(3), pp. 435–441. doi: 10.1093/carcin/bgp327.

Reardon, D. M., Warner, B. and Trowbridge, E. A. (1991) 'EDTA, the traditional anticoagulant of haematology: with increased automation is it time for a review?', *Medical laboratory sciences*, 48(1), pp. 72–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905774> (Accessed: 25 June 2019).

Rendu, F. and Brohard-Bohn, B. (2001) 'The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions', *Platelets*, 12(5), pp. 261–273. doi: 10.1080/09537100120068170.

Rendu, H. (1896) 'Epistaxis repetees chez un sujet porteur de petits angiomes cutanes et muqueux', *Bulletin Societe Medicale des Hopitaux de Paris*, 13, pp. 731–733. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10009476246/> (Accessed: 20 May 2019).

Rijken, D. C. and Lijnen, H. R. (2009) 'New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), pp. 4–13. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x.

Riley, R. S. *et al.* (2016) 'Fibrinogen Thrombin FXIIIa Crosslinking Plasmin Degradation Fibrinopeptides A and B Fibrin Polymer Crosslinked Fibrin Representative Fibrin Degradation Products Fibrin'. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Fibrinogen-Thrombin-FXIIIa-Crosslinking-Plasmin-A-B-Riley-Gilbert/1b3681e5311b225ab0444d6e3800c1c9a9b3c1b9> (Accessed: 15 October 2019).

Rimmer, J. and Lund, V. (2015) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia', *Rhinology journal*, 53(3), pp. 195–203. doi: 10.4193/Rhin14.274.

Roman, B. L. and Hinck, A. P. (2017) 'ALK1 signaling in development and disease: new paradigms.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. NIH Public Access, 74(24), pp. 4539–4560. doi: 10.1007/s00018-017-2636-4.

Rosenberg, R. D. and Damus, P. (1973) 'The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor', *Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Available at: <http://www.jbc.org/content/248/18/6490.short> (Accessed: 7 June 2019).

Rossi, E. *et al.* (2013) 'Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration.', *Blood*, 121(2), pp. 403–15. doi: 10.1182/blood-2012-06-435347.

Rossi, E. *et al.* (2016) 'Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(8), pp. 1715–39. doi: 10.1007/s00018-015-2099-4.

Rossi, E. *et al.* (2018) 'Human endoglin as a potential new partner involved in platelet–endothelium interactions', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(7), pp. 1269–1284. doi: 10.1007/s00018-017-2694-7.

Rossi, E., Lopez-Novoa, J. M. and Bernabeu, C. (2014) 'Endoglin involvement in integrin-mediated cell adhesion as a putative pathogenic mechanism in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1).', *Frontiers in genetics*. Frontiers Media SA, 5, p. 457. doi: 10.3389/fgene.2014.00457.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987) 'New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.', *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), pp. 491–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2821619> (Accessed: 30 April 2019).

Saba, H. I., Morelli, G. A. and Logrono, L. A. (1994) 'Treatment of Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia with Aminocaproic Acid', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 330(25), pp. 1789–1790. doi: 10.1056/NEJM199406233302504.

Sabba, C. *et al.* (2006) 'Life expectancy in patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia', *QJM*. Narnia, 99(5), pp. 327–334. doi: 10.1093/qjmed/hcl037.

Sabbà, C., Gallitelli, M. and Palasciano, G. (2001) 'Efficacy of Unusually High Doses of Tranexamic Acid for the Treatment of Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 345(12), pp. 926–926. doi: 10.1056/NEJM200109203451216.

Saito, M. S. *et al.* (2016) 'New approaches in tail-bleeding assay in mice:

improving an important method for designing new anti-thrombotic agents.’, *International journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell, 97(3), pp. 285–92. doi: 10.1111/iep.12182.

Santos, J. W. A. dos *et al.* (2007) ‘Telangiectasia hemorrágica hereditária: uma causa rara de anemia grave’, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 33(1), pp. 109–112. doi: 10.1590/S1806-37132007000100020.

Sanz-Rodriguez, F. *et al.* (2004) ‘Mutation Analysis in Spanish Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Deficient Endoglin Up-regulation in Activated Monocytes’, *Clinical Chemistry*, 50(11), pp. 2003–2011. doi: 10.1373/clinchem.2004.035287.

Saunders, W. H. (1960) ‘Hereditary hemorrhagic telangiectasia. Control of nosebleeds by septal dermoplasty.’, *JAMA*, 174, pp. 1972–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13746809> (Accessed: 24 May 2019).

Sautter, N. B. and Smith, T. L. (2016) ‘Treatment of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia–Related Epistaxis’, *Otolaryngologic Clinics of North America*. Elsevier, 49(3), pp. 639–654. doi: 10.1016/J.OTC.2016.02.010.

Scharpfenecker, M. *et al.* (2009) ‘Ionizing Radiation Shifts the PAI-1/ID-1 Balance and Activates Notch Signaling in Endothelial Cells’, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 73(2), pp. 506–513. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.09.052.

Schneider, M. and Nesheim, M. (2004) ‘A Study of the Protection of Plasmin from Antiplasmin Inhibition within an Intact Fibrin Clot during the Course of Clot Lysis’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), pp. 13333–13339. doi: 10.1074/jbc.M313164200.

Schousboe, I. (2003) ‘Binding of activated Factor XII to endothelial cells affects its inactivation by the C1-esterase inhibitor.’, *European journal of*

biochemistry, 270(1), pp. 111–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12492481> (Accessed: 16 May 2019).

Seehafer, J. G. *et al.* (1988) 'The functional cell surface glycoprotein CD9 is distinguished by being the major fatty acid acylated and a major iodinated cell-surface component of the human platelet', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 952, pp. 92–100. doi: 10.1016/0167-4838(88)90105-7.

Seki, T., Yun, J. and Oh, S. P. (2003) 'Arterial Endothelium-Specific Activin Receptor-Like Kinase 1 Expression Suggests Its Role in Arterialization and Vascular Remodeling', *Circulation Research*, 93(7), pp. 682–689. doi: 10.1161/01.RES.0000095246.40391.3B.

Shah, Rahul K, Dhingra, J. K. and Shapshay, S. M. (2002) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a review of 76 cases.', *The Laryngoscope*, 112(5), pp. 767–73. doi: 10.1097/00005537-200205000-00001.

Shah, Rahul K., Dhingra, J. K. and Shapshay, S. M. (2002) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Review of 76 Cases', *The Laryngoscope*, 112(5), pp. 767–773. doi: 10.1097/00005537-200205000-00001.

Shattil, S., Cunningham, M. and Hoxie, J. (1987) 'Detection of activated platelets in whole blood using activation- dependent monoclonal antibodies and flow cytometry', *Blood*, 70(1). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/70/1/307.long?sso-checked=true> (Accessed: 25 March 2019).

Shattil, S. J., Kashiwagi, H. and Pampori, N. (1998) 'Integrin signaling: the platelet paradigm.', *Blood*, 91(8), pp. 2645–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531572> (Accessed: 2 May 2019).

Shi, Y. and Massagué, J. (2003) 'Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.', *Cell*, 113(6), pp. 685–700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600> (Accessed: 23 April 2019).

Shovlin, C. L. *et al.* (1994) 'A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3', *Nature Genetics*, 6(2), pp. 205–209. doi: 10.1038/ng0294-205.

Shovlin, C. L. *et al.* (2000) 'Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome).', *American journal of medical genetics*, 91(1), pp. 66–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751092> (Accessed: 30 March 2019).

Shovlin, C. L. *et al.* (2007) 'Elevated factor VIII in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Association with venous thromboembolism', *Thrombosis and Haemostasis*, 98(5), pp. 1031–1039. doi: 10.1160/TH07-01-0064.

Shovlin, C. L. (2010) 'Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment', *Blood Reviews*. Churchill Livingstone, 24(6), pp. 203–219. doi: 10.1016/J.BLRE.2010.07.001.

Silva, B. M. *et al.* (2013) 'Lifestyle and Dietary Influences on Nosebleed Severity in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia', *The Laryngoscope*. John Wiley & Sons, Ltd, 123(5), pp. 1092–1099. doi: 10.1002/lary.23893.

Sira, J. (2016) *Physiology of haemostasis*. doi: 10.1016/j.mpaic.2015.11.004.

Smith, S. A., Travers, R. J. and Morrissey, J. H. (2015) 'How it all starts: Initiation of the clotting cascade', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(4), pp. 326–336. doi: 10.3109/10409238.2015.1050550.

Sopeña, B. *et al.* (2013) 'High prevalence of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia', *European Journal of Internal Medicine*, 24(3), pp. e30–e34. doi: 10.1016/j.ejim.2012.11.012.

Spronk, H. M. H. *et al.* (2014) 'Pleiotropic effects of factor Xa and

thrombin: what to expect from novel anticoagulants', *Cardiovascular Research*. Narnia, 101(3), pp. 344–351. doi: 10.1093/cvr/cvt343.

Srinivasan, S. *et al.* (2003) 'A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2', *Human Molecular Genetics*, 12(5), pp. 473–482. doi: 10.1093/hmg/ddg050.

St-Jacques, S. *et al.* (1994) 'Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells.', *Endocrinology*, 134(6), pp. 2645–2657. doi: 10.1210/endo.134.6.8194490.

Steel, D. *et al.* (1988) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia. A family study.', *American journal of clinical pathology*, 90(3), pp. 274–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3137802> (Accessed: 4 May 2019).

Su, A. I. *et al.* (2004) 'A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), pp. 6062–6067. doi: 10.1073/pnas.0400782101.

Sudarshan, A., Natelson, E. A. and Gordon, C. (1985) 'Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Factor VIII Inhibitor', *Southern Medical Journal*, 78(5), pp. 623–624. doi: 10.1097/00007611-198505000-00030.

Sugiura, Y., Kawashima, Y. and Watanabe, K. (1991) '[Hereditary hemorrhagic telangiectasia associated with von Willebrand's disease; literature review].', *[Rinsho ketsueki] The Japanese journal of clinical hematology*, 32(9), pp. 958–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1942541> (Accessed: 22 May 2019).

Sureda, A. *et al.* (1991) 'Hereditary hemorrhagic telangiectasia: analysis of platelet aggregation and fibrinolytic system in seven patients.', *Acta haematologica*, 85(3), pp. 119–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710408> (Accessed: 22 April 2016).

Thiagarajan, P. and Kelly, K. L. (1988) 'Exposure of binding sites for

vitronectin on platelets following stimulation.’, *The Journal of biological chemistry*, 263(6), pp. 3035–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2449435> (Accessed: 10 May 2019).

Tian, H. *et al.* (2012) ‘Endoglin mediates fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$ integrin and TGF- β pathway crosstalk in endothelial cells.’, *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 31(19), pp. 3885–900. doi: 10.1038/emboj.2012.246.

Torsney, E. *et al.* (2003) ‘Mouse Model for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Has a Generalized Vascular Abnormality’, *Circulation*, 107(12), pp. 1653–1657. doi: 10.1161/01.CIR.0000058170.92267.00.

Townson, S. A. *et al.* (2012) ‘Specificity and Structure of a High Affinity Activin Receptor-like Kinase 1 (ALK1) Signaling Complex’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp. 27313–27325. doi: 10.1074/jbc.M112.377960.

Tseng, M. T. *et al.* (2006) ‘Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery’, *Thrombosis Research*, 118(2), pp. 275–280. doi: 10.1016/j.thromres.2005.09.004.

Tual-Chalot, S. *et al.* (2014) ‘Endothelial Depletion of Acvrl1 in Mice Leads to Arteriovenous Malformations Associated with Reduced Endoglin Expression’, *PLoS ONE*. Edited by V. Kaartinen, 9(6), p. e98646. doi: 10.1371/journal.pone.0098646.

Tual-Chalot, S., Oh, S. P. and Arthur, H. M. (2015) ‘Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges’, *Frontiers in Genetics*, 6, p. 25. doi: 10.3389/fgene.2015.00025.

Tuckwell, D. S. *et al.* (1994) ‘Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge.’, *Journal of cell science*, 107 (Pt 4), pp. 993–

1005. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520045> (Accessed: 2 May 2019).

Turner, N. *et al.* (2006) 'Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(6), pp. 1396–1404. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01959.x.

Upton, P. D. *et al.* (2009) 'Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Activin Type II Receptors Balance BMP9 Signals Mediated by Activin Receptor-like Kinase-1 in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), pp. 15794–15804. doi: 10.1074/jbc.M109.002881.

Vase, P. and Grove, O. (1986) 'Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *Gastroenterology*, 91(5), pp. 1079–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3489651> (Accessed: 5 April 2019).

Vaughan, D. E. *et al.* (2017) 'Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Marker and a Mediator of Senescence.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. NIH Public Access, 37(8), pp. 1446–1452. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309451.

Velasco, S. *et al.* (2008) 'L- and S-endoglin differentially modulate TGF 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts', *Journal of Cell Science*, 121(6), pp. 913–919. doi: 10.1242/jcs.023283.

Versteeg, H. H. *et al.* (2013) 'New Fundamentals in Hemostasis', *Physiological Reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD, 93(1), pp. 327–358. doi: 10.1152/physrev.00016.2011.

Wagner, C. *et al.* (1996) 'Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets', *Blood*, 88(3). Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/88/3/907.long?sso-checked=true> (Accessed: 2 May 2019).

Walshe, T. E. *et al.* (2009) 'TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature', *PLoS ONE*. Edited by O. Eickelberg, 4(4), p. e5149. doi: 10.1371/journal.pone.0005149.

Warnock, L. B. and Huang, D. (2019) *Heparin, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855835> (Accessed: 24 March 2019).

Watanabe, M., Hanawa, S. and Morishima, T. (1985) '[Fibrinolytic activity in cutaneous lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia].', *Nihon Hifuka Gakkai zasshi. The Japanese journal of dermatology*, 95(1), pp. 11–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039768> (Accessed: 22 July 2019).

Watson, S. P. (2009) 'Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis.', *Current pharmaceutical design*, 15(12), pp. 1358–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19355974> (Accessed: 16 May 2019).

Weber, F. (1907) 'Multiple hereditary developmental angiomas (telangiectases) of the skin and mucous membranes associated with recurring hemorrhages.', *The Lancet*. Elsevier, 170(4377), pp. 160–162. doi: 10.1016/S0140-6736(00)32590-9.

Weingarten, T. N. *et al.* (2013) 'Management of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia undergoing general anesthesia: a cohort from a single academic center's experience', *Journal of Anesthesia*, 27(5), pp. 705–711. doi: 10.1007/s00540-013-1601-0.

Weis, S. M. and Cheresch, D. A. (2011) 'Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets', *Nature Medicine*, 17(11), pp. 1359–1370. doi: 10.1038/nm.2537.

Wiercinska, E. *et al.* (2006) 'Id1 is a critical mediator in TGF- β -induced

transdifferentiation of rat hepatic stellate cells', *Hepatology*, 43(5), pp. 1032–1041. doi: 10.1002/hep.21135.

Wilcox, J. N. *et al.* (1989) 'Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), pp. 2839–2843. doi: 10.1073/pnas.86.8.2839.

Wirsching, K. E. C. and Kühnel, T. S. (2017) 'Update on Clinical Strategies in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia from an ENT Point of View', *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*. Korean Society of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery, 10(2), p. 153. doi: 10.21053/CEO.2016.00318.

Wolberg, A. S. (2007) 'Thrombin generation and fibrin clot structure', *Blood Reviews*, 21(3), pp. 131–142. doi: 10.1016/j.blre.2006.11.001.

Wolinsky, H. (1980) 'A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis.', *Circulation research*, 47(3), pp. 301–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6996862> (Accessed: 7 May 2019).

Wooderchak-Donahue, W. L. *et al.* (2013) 'BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia.', *American journal of human genetics*. Elsevier, 93(3), pp. 530–7. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.004.

Yan, S. F. *et al.* (1999) 'Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(9), pp. 2029–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479642> (Accessed: 16 May 2019).

Yau, J. W., Teoh, H. and Verma, S. (2015) 'Endothelial cell control of thrombosis.', *BMC cardiovascular disorders*. BioMed Central, 15, p. 130. doi: 10.1186/s12872-015-0124-z.

Zaffar, N. *et al.* (2015) 'The use of anti-fibrinolytic agents in patients with HHT: a retrospective survey', *Annals of Hematology*. Springer Berlin Heidelberg, 94(1), pp. 145–152. doi: 10.1007/s00277-014-2169-y.

Zarrabeitia, R. *et al.* (2017) 'Quality of life in patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT)', *Health Qual Life Outcomes*. doi: 10.1186/s12955-017-0586-z.

Zwaal, R. F. and Schroit, A. J. (1997) 'Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.', *Blood*, 89(4), pp. 1121–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028933> (Accessed: 26 May 2019).

The background of the entire page is a light gray technical drawing. It features various mechanical components such as gears of different sizes, circles, rectangles, and lines. Some lines are solid, while others are dashed, suggesting hidden parts of a drawing. There are also some numerical annotations and arrows scattered throughout the drawing, giving it a complex, engineering-like appearance.

SUMMARY

“The one who plants trees knowing they will never sit in their shade,
has started to understand the meaning of life”

Rabindranath Tagore

Study of hemostasis process in murine models of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia

Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT), also known as Osler-Weber-Rendu disease, is an autosomal-dominant genetic disorder involving mutations in two predominant genes known as endoglin (*ENG*; HHT1) and activin receptor-like kinase 1 (*ACVRL1/ALK1*; HHT2), as well as some less frequent genes, such as *MADH4 / SMAD4* (JP-HHT) or *BMP9/GDF2* (HHT5) (Begbie, Wallace and Shovlin, 2003).

HHT is characterized by the presence of multiple dermal, mucous and visceral vascular malformations, as well as recurrent and severe haemorrhages [2,3]. The most common vascular lesions of the disease consist of telangiectasias, which are small vasodilatations visible on the skin surface and mucous membranes (Govani and Shovlin, 2009), and arteriovenous malformations (AVM) that are direct abnormal communications between an artery and a vein. In HHT, AVM are frequently located in lungs (15-50%), liver (5-30%), gastrointestinal tract (20-70%) and nervous system (10%) [4-6] and they are considered one of the most severe manifestations of the disease, due to the complications that they entail. Thromboembolism, pulmonary haemorrhage, dyspnoea, hypoxemia and ischemic attacks are some of the most frequent complications derived from pulmonary AVM. According to hepatic AVM, they could imply portal hypertension or biliary disease, and CNS AVM can cause more serious diseases such as migraines, epileptic seizures or even acute paraplegia [7- 10].

Due to their anomalous morphology, which implies more fragile vessel walls and the generation of turbulent flow, vessel malformations are responsible for the high frequency of appearance of haemorrhages, which are the other most common clinical manifestations of HHT (Pau, Carney and

Murty, 2001). Generally, nosebleeds, also known as epistaxis, are not only the first symptom to manifest but they are also very frequent, since patients usually suffer more than once a week. This frequency increase with age and 12% of diagnosed cases have more than one bleeding per day (Dheyauldeen, Abdelnoor and Bachmann-Harildstad, 2011). The intensity can vary from a few drops to events that last up to 10 minutes [13, 14]. The combination of the high frequency linked to the severity of the bleeding leads 50% of patients to develop iron deficiency anaemia (Pahl, Choudhury and Kasthuri, 2016). Usually, bleeds are so uncontrolled that administration of iron supplement is not enough to reverse anaemia, so it is not uncommon to treat patients with repeated blood transfusions [16, 17].

Although it is known that all affected genes are part of the TGF- β growth factor signalling pathway, the exact sequence by which the clinical manifestations develop remains unknown. In addition, it is accepted that due to the important role of the TGF- β superfamily in angiogenesis, its signalling deficiency would imply poor angiogenesis that would lead to the formation of abnormal vessels. As mentioned above, AVMs are more fragile and, therefore, are more susceptible to break and trigger haemorrhages (Rahul K. Shah, Dhingra and Shapshay, 2002). However, we think that the fragility of blood vessels would explain haemorrhage frequency, but not the quantity of haemorrhages. Nevertheless, it is also unknown if the hemostasis system is altered in HHT patients.

Since the origin of HHT is genetic, the ideal therapeutic approach should be gene therapy, but this kind of therapy is not consolidated. Moreover, there is a lack of information about the exact molecular mechanisms involved in the pathophysiological development of HHT symptoms. Thus, nowadays there is no medical treatment that prevents the appearance of clinical manifestations, so the majority of therapies focus on alleviating or reducing symptoms [19, 20]. Therefore, we considered an important goal to develop

a project that confirm or discard alterations in the haemostatic process in HHT patients.

For this purpose, we have used two murine models. First, a heterozygous mouse deficient in endoglin gene ($Eng^{+/-}$), model of HHT type 1. And, on the other hand, a murine model for type 2 of HHT, which have a deletion in one of the copies of Alk1 gene ($Alk1^{+/-}$). Control groups were formed by wild type mice from the same litter.

Our first step was to analyse if these HHT murine models present difficulties stopping a controlled haemorrhage, so we measured tail bleeding time (Saito *et al.*, 2016). Our results show that both groups of animals, $Eng^{+/-}$ and $Alk1^{+/-}$ mice, have a significantly longer bleeding time compared with their respective control groups (Figure 1).

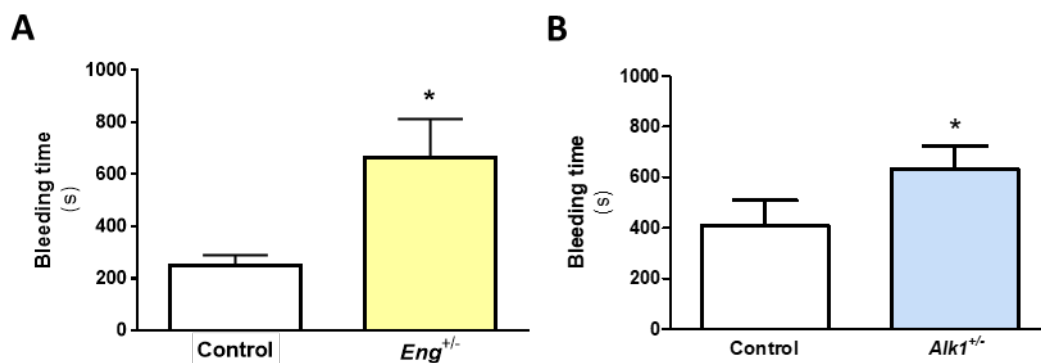


Figure 1. Bleeding time or total bleeding time. Analysis of the sum of periods in which bleeding is active, or total bleeding time of $Eng^{+/-}$ (A) and $Alk1^{+/-}$ mice (B).

Two components make up this parameter, the first bleeding time, which is the period between the start of the haemorrhage and when it stops for the first time, and the rebleeding time. It is frequent that the haemorrhage restarts again after the first stop, so, the period between the new start and the next stop is called rebleeding, and the sum of all these rebleeds is called rebleeding time or total rebleeding time. Both parameters were analysed individually.

While no differences were shown in the first bleeding time (Figure 2A-B), both heterozygous animals showed a markedly longer rebleeding time compared with their own control group (Figure 2C-D). The fact that these mice have longer haemorrhages suggests that alterations in haemostasis system could exist.

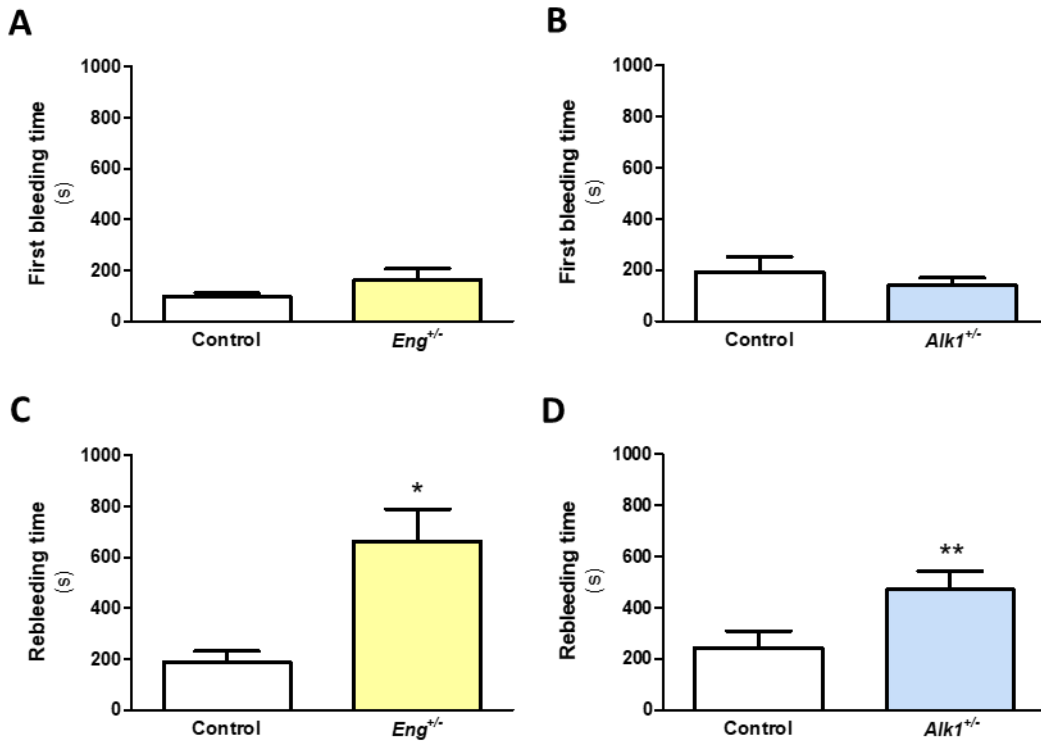


Figure 2. First bleeding time and (total) rebleeding time. (A y B) Quantification of the first bleeding time, the period since the start of the haemorrhage until it stops for the first time. (C y D) Analysis of the rebleeding time, the sum of the rest of the times where the bleeding is active or bleeding time.

Because of the essential role of platelets in the hemostasis system, the majority of the few publications of hemostasis in HHT focus on analysing the platelet activity. Some of these articles describe alterations in the functionality of platelets acquired from HHT patients [22-25]. However, they were all isolated cases of patients and there are studies published in the same period that show normal platelet parameters [2, 26-28]. This has generated some controversy, so we have considered convenient to carry out

studies of platelet function with experimental animal models that involve more controlled conditions and a more sensitive analysis.

Our results showed that *in vivo* count of no-aggregated platelet before and after the induction of a thrombotic event did not show difference in the response of neither murine model compared with each control group (Figure 3) (DiMinno and Silver, 1983). Also, we further studied platelet activation and aggregation activity and no differences were found (Figure 3) (Miyazawa *et al.*, 2019). These similar responses of platelets indicate that neither *Eng* nor *Alk1* deletion affect platelet.

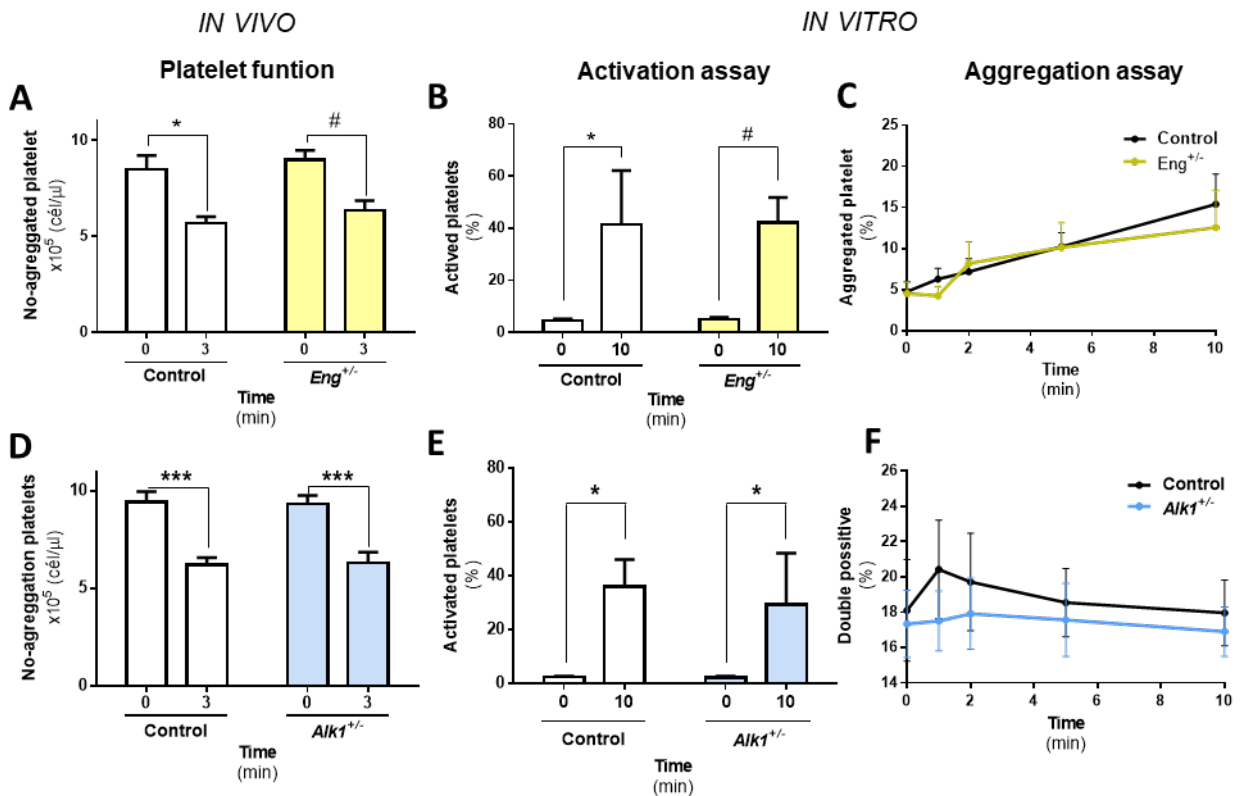


Figure 3. Study of platelet function. (A&D) *In vivo* study of platelet concentration before and after a thrombogenic event. Concentration of free platelets at baseline (t = 0 min) and 3 minutes after the injection of collagen and epinephrine (t = 3 min). (B-C; E-F) *In vitro* study of the activation and aggregation of platelets from heterozygous mice. (B&E) Quantification of active platelet population under baseline conditions (t = 0 min) and after 10 minutes of thrombin activator stimulation (t = 10 min). (C&F) Analysis of the percentage of aggregated platelet during 10 minutes of stimulation by thrombin.

In our opinion, it makes sense that alterations in hemostasis are not due to impaired platelet function. As explained above, studying platelet activity in HHT patient samples is very accessible and quite easy to perform at almost every hospital. Thus, if there were a problem with HHT patients' platelets, it would have been detected decades ago. However, our study, developed under controlled conditions, confirm that the platelets of both animal models have a similar behaviour to that of their control groups.

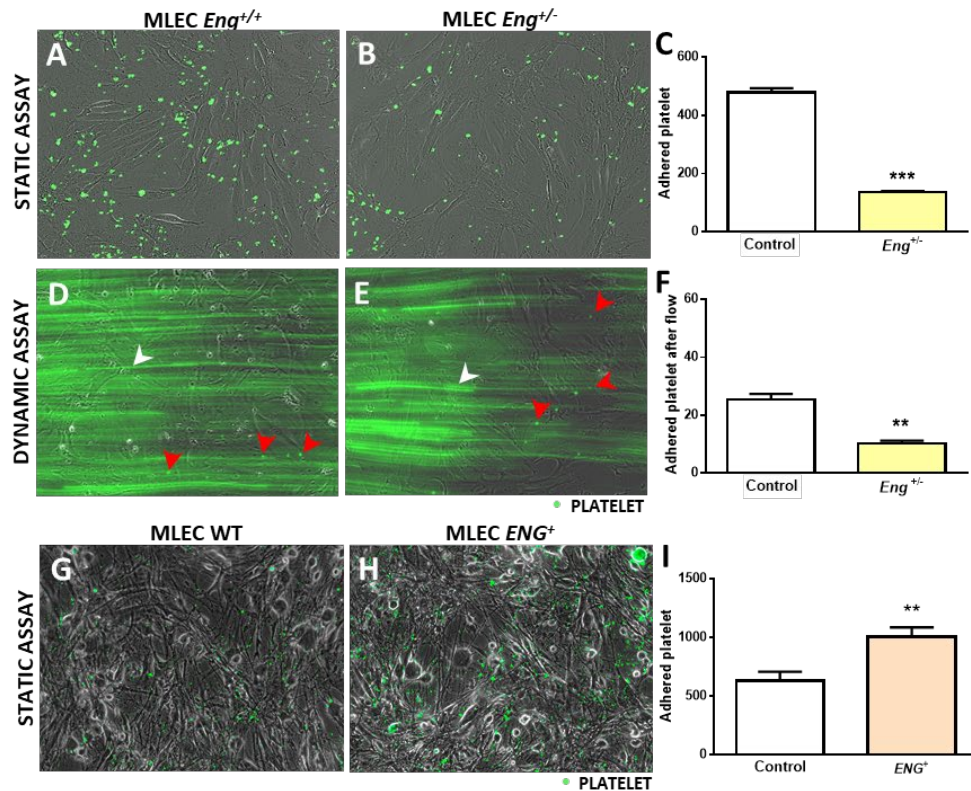
In the same way, it is easy to try to find the causes of hemostasis alterations in coagulation cascade defects, also known as secondary hemostasis. However, HHT is not a disease that have deficiencies in any of the clotting factors (Kritharis, Al-Samkari and Kuter, 2018). Therefore, because there is no evidence in the literature indicating the existence of any defect in coagulation factors, plus the fact that these alterations are easily detectable in the clinic, we decided that the expenditure of animals and resources for study secondary hemostasis in these models of HHT were not justified.

Once the new platelet plug is formed, the generation of secondary bonds by platelet is essential in thrombus stabilization. Otherwise the new thrombus would be dragged because of the bloodstream (Angelillo-Scherrer, 2004). Platelets have a large number and variety of integrins. Specifically, there is a majority group of integrins that are characterized by interacting with the RGD domain, which gives platelets their adhesion capacity. This amino acid sequence is repeated in many proteins, including endoglin [33, 34]. In 2018, Rossi *et al* described that the total absence of endoglin produced a decrease in platelet adhesion above endothelium (Rossi *et al.*, 2018). However, this study does not demonstrate whether the effect depended on complete protein silencing or if haploinsufficiency would also influence such adhesion.

Our results, acquired from *Eng^{+/-}* animals, showed that partial endoglin deficiency is sufficient to generate lower adhesion and lower resistance to *in vitro* flow (Figure 4A-F) (Rossi *et al.*, 2018). This implies a delay in the formation of the stable thrombus after stimulation of the carotid with ferric chloride (Figure 4J&K) (Eckly *et al.*, 2011). In addition, we demonstrate that there is a direct relationship between endoglin levels and the interaction of endoglin with platelet integrins, since experiments developed in mice that overexpress human endoglin showed that large levels of endoglin increases adhesion (Figure 4G-I), flow resistance and (Figure 4L&M), as a consequence, the formation of a thrombus more stable.

Thus, endoglin seems to participate in thrombus stabilization, and the absence of this protein will generate fewer stable plugs that could be dragged through the bloodstream. This would explain the existence of longer haemorrhages, and in part, the high risk of thrombosis of these patients.

IN VITRO ADHESION EXPERIMENTS



IN VIVO THROMBUS STABILIZATION EXPERIMENTS

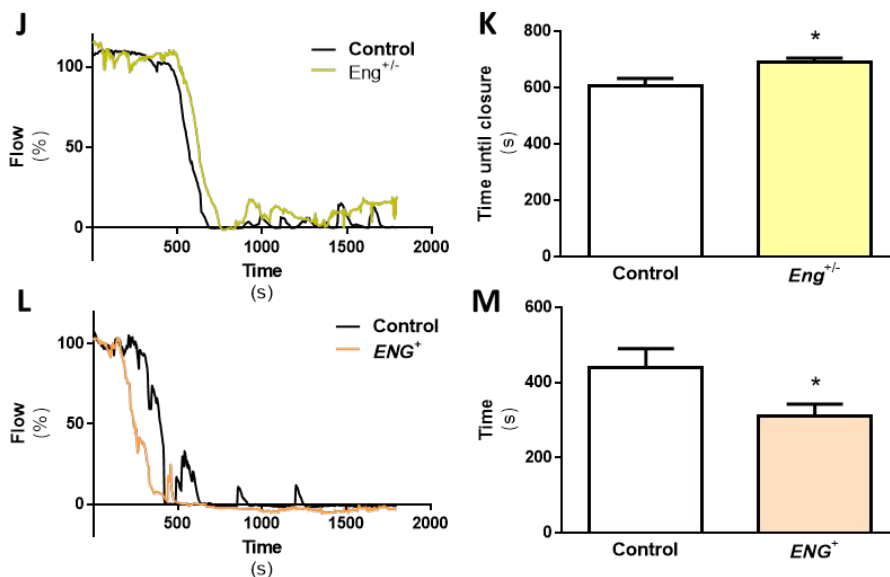


Figure 4. Study of thrombus stabilization. Images of the monolayer of endothelial cells and adhered platelets (stained green) (A-B; D-E; G-H). A-B and G-H represent the study of adhesion under static conditions and D-E represent the study of platelets that have remained attached after being subjected to a flow of 0.4 ml / min for 2 min. (C, F & I) Quantification of the number of platelets adhered to the endothelial cell monolayer. (J-M) Study of the flow of the interior of the carotid before a thrombosis induced by ferric chloride in mice. (J&L) Average flow records. (K&M) Quantification of time needed to stop the flow permanently by thrombus grow.

According to *Alk1*^{+/-} mice models, we decided to study fibrinolysis system as part of hemostasis process. The endothelium plays an essential role in fibrinolysis, since it is described that endothelial cells synthesize and release two of the most important components of this process, t-PA and PAI-1 (Akao *et al.*, 2003). As described in the literature, in KO *Alk1*^{-/-} mice, the deficiency of this gene is related to an increase of t-PA and PAI-1 expression (Oh *et al.*, 2000). For this reason, we analysed if the deficiency of the *Alk1* gene affect the proper functioning of fibrinolysis.

Our results show that *Alk1*^{+/-} mice have highly increased levels of t-PA, as well as plasminogen levels, after the induction of a thrombotic event (DiMinno and Silver, 1983) (Figure 5A&B). Moreover, the increment of PAI-1 levels in plasma are lower compared with control group (Figure 5C). Thus, levels of PAI-1 seem to be insufficient to inhibit and regulate the activity of t-PA and, at the same time, t-PA has a greater availability of its substrate, the plasminogen. It should be noted that our results do not necessarily contradict what is described in the bibliography. We think that although the increase PAI-1, as a consequence of *Alk1* deficiency, is not shown in the graph, it does not mean that it is not happening. We think that abnormally high levels of t-PA may mask this PAI-1 increase.

Therefore, all these conditions entail greater activation of plasminogen, which would result in an upregulation of fibrin degradation and disaggregation of fibrin thrombus. This profibrinolytic state is confirmed with the highest levels of the fibrinolysis product, the dimer D (Figure 5D).

Taking all these into account, *Alk1* deficiency generates a profibrinolytic state, which could justify the presence of longer haemorrhages bleeding.

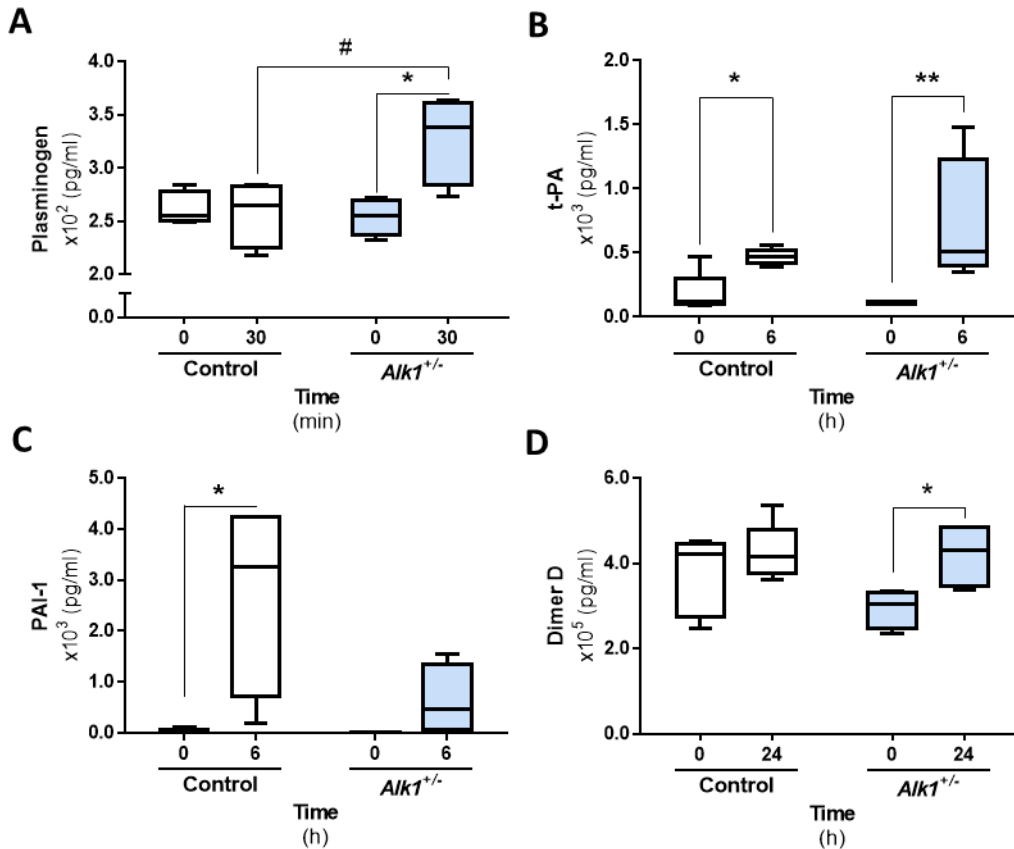


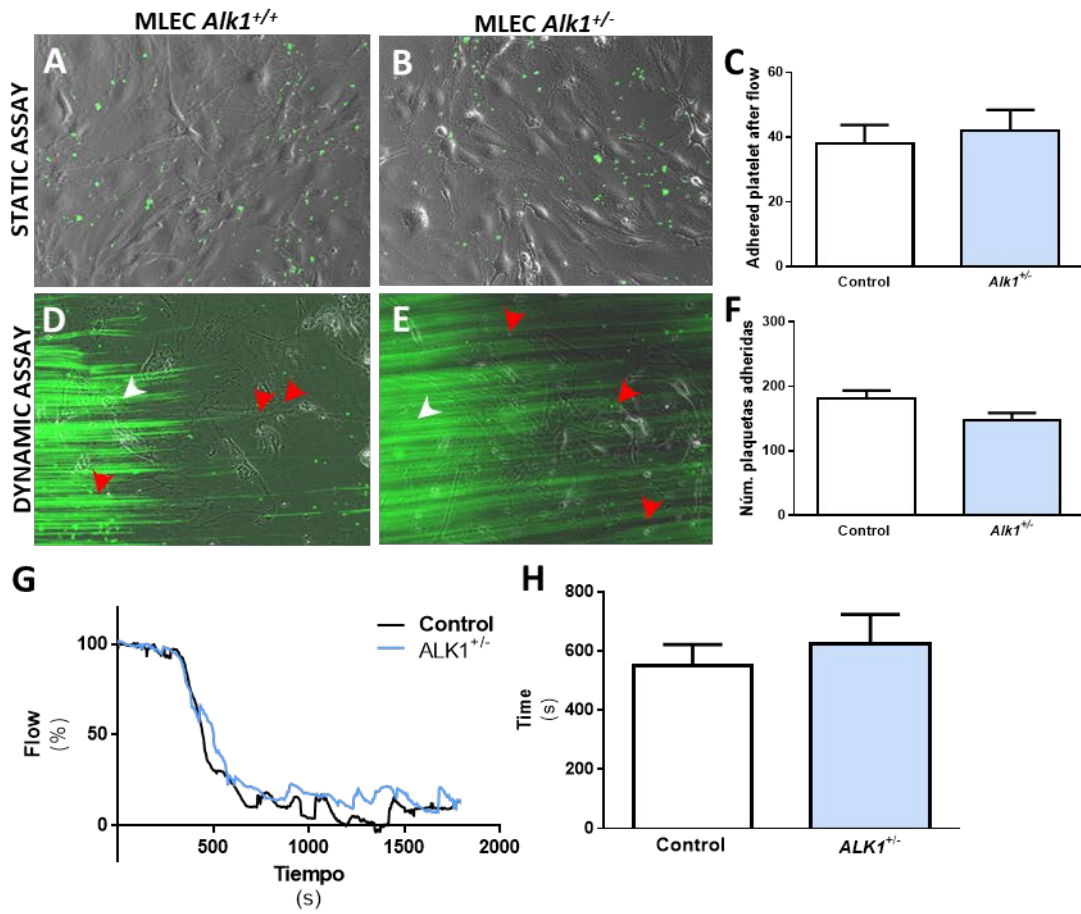
Figure 5. Analysis of plasma concentration of the main components of fibrinolysis system in *Alk1*^{+/-} mice. Quantification of concentration of the main components of fibrinolysis: (A) Plasminogen, (B) t-PA, (C) PAI-1 and (D) Dimer D. Their basal levels are represented (t = 0 min; t = 0 h) and levels after an acute thrombotic event (t = 30 min; t = 6 h; t = 6 h; t = 24 h, respectively).

Finally, although our results lead us to believe that *Eng* haploinsufficiency leads to an alteration of hemostasis through a decrease in thrombus stabilization and *Alk1* haploinsufficiency due to an increased fibrinolysis process, we cannot obviate the fact that the expression of these two genes are related. The expression of *ENG* and *ALK1* are directly related, thus, the decrease of one would lead to the decrease of the expression of the other one [38, 39]. For this reason, the data was analysed globally, and it was observed that, *Alk1*^{+/-} model tends to show the same alterations as in *Eng*^{+/-} mice, and vice versa.

In *Alk1^{+/-}* mice, it is observed that platelets have a trend to generate less junctions to Alk1-deficient endothelial cells (Figure 6A-F) (Rossi *et al.*, 2018). Also, in *in vivo* studies, where a local thrombogenesis induced by FeCl₃ is generated to study the decrease in flow as a result of the growth of the thrombus that is generated on the vascular wall, it is observed that there is also a tendency of *Alk1^{+/-}* mice needing more time to generate a thrombus large and stable enough to occlude the carotid (Figure 6G&H) (Eckly *et al.*, 2011). The fact of not having obtained statistically significant results is not an excluding factor. It is foreseeable that the lack of Alk1 does not generate large differences in platelet adhesion, because Alk1 does not have the RGD domain. However, platelets tend to decrease their adhesion to the endothelium, adhesion that according to our data is mediated by endoglin, then, there seems to be a decrease in endoglin that favours alterations in thrombus stabilization.

If we refer to the data of fibrinolysis components in the plasma of *Eng^{+/-}* mice, it is observed that these mice tend to have higher levels of t-PA, (Figure 6J) and that the increase in PAI-1 levels after induction of thrombogenesis is significantly enhanced compared with control group (Figure 6K). In the same way, these results are not as significant as those obtained in Alk1 mice, but it is not described that exists a direct relationship between the expression of Eng and PAI-1 or t-PA, so these modifications are predictably due to the decrease in Alk1.

STUDY OF THROMBUS STABILIZATION IN *Alk1*^{+/-} MICE



STUDY OF FIBRINOLYSIS IN *Eng*^{+/-} MICE

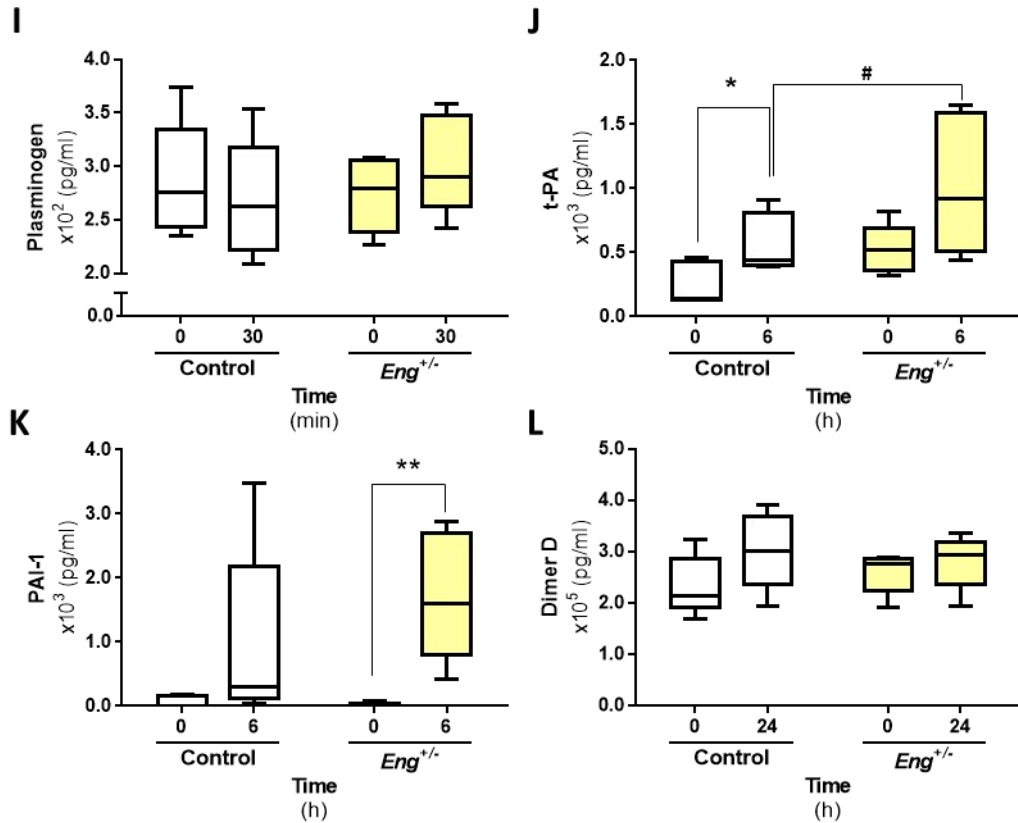


Figure 6. Study of thrombus stabilization in *Alk1^{+/-}* mice and the Study of fibrinolysis in *Eng^{+/-}* mice. Images of the monolayer of endothelial cells and adhered platelets (stained green) (A-B; D-E). A-B represent the study of adhesion under static conditions and D-E represent the study of platelets that have remained attached after being subjected to a flow of 0.4 ml / min for 2 min. (C&F) Quantification of the number of platelets adhered to the endothelial cell monolayer. (G&H) Study of the flow of the interior of the carotid before a thrombosis induced by ferric chloride in mice. (G) Average records of the flow into the carotid while thrombus is generating. (H) Quantification of time needed to stop the flow permanently by thrombus grow. (I-L) Analysis of plasma concentration of the main components of fibrinolysis system in *Eng^{+/-}* mice. Quantification of concentration of the main components of fibrinolysis: (I) Plasminogen, (J) t-PA, (K) PAI-1 and (L) Dimer D. Their basal levels are represented (t = 0 min; t = 0 h) and levels after an acute thrombotic event (t = 30 min; t = 6 h; t = 6 h_{yt} = 24 h, respectively).

From the results above described we can obtain the following conclusions:

1. Haemostasis system is altered in heterozygous *Eng* and *Alk1* mice.
2. Endoglin haploinsufficiency affects thrombus stabilization due to deficient interactions between platelets and endothelial cells.
3. *Alk1* deficiency generates an upregulation of fibrinolysis system.
4. The relationship between *Eng* and *Alk1* expression leads a common phenotype of impaired hemostasis.

BIBLIOGRAPHY

- [1] M. E. Begbie, G. M. F. Wallace, and C. L. Shovlin, "Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): a view from the 21st century.," *Postgrad. Med. J.*, vol. 79, no. 927, pp. 18–24, Jan. 2003.
- [2] A. Sureda, J. César, L. J. García Frade, A. García Avello, I. Fernández Fuertes, and J. L. Navarro, "Hereditary hemorrhagic telangiectasia: analysis of platelet aggregation and fibrinolytic system in seven patients.," *Acta Haematol.*, vol. 85, no. 3, pp. 119–23, Jan. 1991.
- [3] F. S. Govani and C. L. Shovlin, "Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review.," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 17, no. 7, pp. 860–71, Jul. 2009.
- [4] V. Cottin *et al.*, "Pulmonary Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia," *Medicine (Baltimore)*, vol. 86, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2007.
- [5] M. E. Faughnan *et al.*, "International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia," *J. Med. Genet.*, vol. 48, no. 2, pp. 73–87, Feb. 2011.
- [6] W. Brinjikji, V. N. Iyer, C. P. Wood, and G. Lanzino, "Prevalence and characteristics of brain arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a systematic review and meta-analysis," *J. Neurosurg.*, vol. 127, no. 2, pp. 302–310, Aug. 2017.
- [7] B. Sopena, M. T. Pérez-Rodríguez, D. Portela, A. Rivera, M. Freire, and C. Martínez-Vázquez, "High prevalence of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 24, no. 3, pp. e30–e34, Apr. 2013.
- [8] G. Garcia-Tsao *et al.*, "Liver Disease in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia," *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 13, pp. 931–936, Sep. 2000.
- [9] J. Peterson, "Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Management.," *Radiol. Technol.*, vol. 88, no. 3, pp. 277–294, Jan. 2017.
- [10] C. O. Maher, D. G. Piegras, R. D. Brown, J. A. Friedman, and B. E. Pollock, "Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia.," *Stroke*, vol. 32, no. 4, pp. 877–82, Apr. 2001.
- [11] H. Pau, A. S. Carney, and G. E. Murty, "Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): otorhinolaryngological manifestations.," *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, vol. 26, no. 2, pp. 93–8, Apr. 2001.
- [12] S. Dheyauldeen, M. Abdelnoor, and G. Bachmann-Harildstad, "The Natural History of Epistaxis in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia in the Norwegian population: A Cross-sectional Study," *Am. J. Rhinol. Allergy*, vol. 25, no. 4, pp. 214–218, Jul. 2011.
- [13] H. Plauchu, J.-P. De Chadarévian, A. Bideau, and J.-M. Robert, "Age-related

- clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 32, no. 3, pp. 291–297, Mar. 1989.
- [14] B. M. Silva, A. E. Hosman, H. L. Devlin, and C. L. Shovlin, “Lifestyle and Dietary Influences on Nosebleed Severity in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia,” *Laryngoscope*, vol. 123, no. 5, pp. 1092–1099, May 2013.
- [15] K. Pahl, A. Choudhury, and R. S. Kasthuri, “Causes and Severity of Anemia in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia,” *Blood*, vol. 128, no. 22, 2016.
- [16] T. N. Weingarten *et al.*, “Management of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia undergoing general anesthesia: a cohort from a single academic center’s experience,” *J. Anesth.*, vol. 27, no. 5, pp. 705–711, Oct. 2013.
- [17] S. B. Jackson, N. P. Villano, J. N. Benhammou, M. Lewis, J. R. Pisegna, and D. Padua, “Gastrointestinal Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT): A Systematic Review of the Literature.,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 62, no. 10, pp. 2623–2630, 2017.
- [18] R. K. Shah, J. K. Dhingra, and S. M. Shapshay, “Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Review of 76 Cases,” *Laryngoscope*, vol. 112, no. 5, pp. 767–773, May 2002.
- [19] T. Kühnel, K. Wirsching, W. Wohlgemuth, A. Chavan, K. Evert, and V. Vielsmeier, “Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia,” *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 51, no. 1, pp. 237–254, Feb. 2018.
- [20] E. M. de Gussem *et al.*, “Life expectancy of parents with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia,” *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 11, no. 1, p. 46, Dec. 2016.
- [21] M. S. Saito *et al.*, “New approaches in tail-bleeding assay in mice: improving an important method for designing new anti-thrombotic agents.,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 97, no. 3, pp. 285–92, 2016.
- [22] T. Muckle, “Low in-vivo adhesive-platelet count in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia,” *Lancet*, vol. 285, no. 7377, p. 169, Jan. 1965.
- [23] S. O. Larsson, “Osler’s disease with impaired adhesion and aggregation of platelets,” *Acta Med. Scand.*, vol. 196, no. 1–6, pp. 133–136, Apr. 1974.
- [24] Y. Endo, S. Mamiya, H. Niitsu, A. Miura, and S. Nishimura, “Reduced platelet aggregation induced by epinephrine and idiopathic thrombocytopenic purpura in hereditary haemorrhagic teleangiectasia.,” *Thromb. Haemost.*, vol. 52, no. 3, p. 369, Dec. 1984.
- [25] M. Pandolfi and B. Ehinger, “Conjunctival bleeding in Osler’s disease with associated platelet dysfunction: A case report,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 56, no. 1, pp. 75–82, May 2009.
- [26] H. C. Kwaan and S. Silverman, “Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia.,” *Arch. Dermatol.*, vol. 107, no. 4, pp. 571–3,

Apr. 1973.

- [27] D. Steel, E. G. Bovill, E. Golden, and B. H. Tindle, "Hereditary hemorrhagic telangiectasia. A family study.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 90, no. 3, pp. 274–8, Sep. 1988.
- [28] J. W. A. dos Santos, T. C. Dalcin, K. R. Neves, K. C. Mann, G. L. N. Pretto, and A. N. Bertolazi, "Telangiectasia hemorrágica hereditária: uma causa rara de anemia grave," *J. Bras. Pneumol.*, vol. 33, no. 1, pp. 109–112, Feb. 2007.
- [29] G. DiMinno and M. J. Silver, "Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 225, no. 1, pp. 57–60, Apr. 1983.
- [30] B. Miyazawa *et al.*, "Regulation of Endothelial Cell Permeability by Platelet-Derived Extracellular Vesicles," *J. Trauma Acute Care Surg.*, p. 1, Feb. 2019.
- [31] A. Kritharis, H. Al-Samkari, and D. J. Kuter, "Hereditary hemorrhagic telangiectasia: diagnosis and management from the hematologist's perspective.," *Haematologica*, vol. 103, no. 9, pp. 1433–1443, Sep. 2018.
- [32] A. Angelillo-Scherrer, "Targeting thrombus stabilization: protection against thrombosis without bleeding?," *Drug Discov. Today Dis. Model.*, vol. 1, no. 3, pp. 279–287, Dec. 2004.
- [33] E. Ruoslahti and M. D. Pierschbacher, "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.," *Science*, vol. 238, no. 4826, pp. 491–7, Oct. 1987.
- [34] A. Gougos and M. Letarte, "Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 15, pp. 8361–4, May 1990.
- [35] E. Rossi *et al.*, "Human endoglin as a potential new partner involved in platelet–endothelium interactions," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 7, pp. 1269–1284, Apr. 2018.
- [36] A. Eckly *et al.*, "Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. 4, pp. 779–789, Apr. 2011.
- [37] M. Akao *et al.*, "Cellular density regulation of plasminogen gene expression in mouse hepatocytes," *Life Sci.*, vol. 72, no. 15, pp. 1695–1704, Feb. 2003.
- [38] S. P. Oh *et al.*, "Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 6, pp. 2626–31, Mar. 2000.
- [39] A. Fernandez-Lopez *et al.*, "Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 13, pp. 1515–1533, Jul. 2007.
- [40] A. Fernández *et al.*, "Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions," *Cardiovasc. Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 235–248, Nov. 2005.

Este es mi homenaje a ellos

Ojalá llegue el día en el que el conocimiento y nuestra capacidad de simular organismos evolucione tanto que no sea necesario utilizar ni un solo animal más.

Hasta entonces,

¡GRACIAS!



Artista ilustradora: Elena González Sánchez (@ele.zissou)

Inspirado en "*Monument to the laboratory mouse*". Novosibirsk, Rusia

