

Inhibición del factor tisular por lipoproteínas de baja densidad*

► Adriana Elena Scoccia¹, María Silvana Molinuevo²

-
1. Lic. en Farmacia y Bioquímica.
 2. Lic. en Cs. Farmacéuticas.

* Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina. E-mail: ascoccia@netverk.com.ar

Resumen

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se cuentan entre los inhibidores circulantes de la actividad procoagulante del factor tisular. El objetivo del trabajo fue explorar el comportamiento electroforético de las proteínas involucradas y la cinética de inhibición que permitieran desarrollar un ensayo cuantitativo *in vitro* capaz de poner en evidencia dicha capacidad. El ensayo cinético consistió en incubar tromboplastina cálcica comercial a 37 °C con volúmenes crecientes de LDL aislada por precipitación selectiva redisuelta; se realizó a distintos tiempos el tiempo de protrombina en una etapa; se calcularon las actividades respectivas y el porcentaje de inhibición de la coagulabilidad respecto a un blanco. Los resultados muestran inhibición creciente hasta los 60 min en el intervalo entre 0,013 y 0,026 nmol de apoB, parámetros que definen las condiciones seleccionadas del ensayo que aplicado sobre 30 muestras de personas normolipémicas de ambos sexos (edades entre 30 y 70 años) presentó una media +/- SEM de 2.512 +/- 101,4 expresadas en porcentaje de inhibición de la coagulabilidad / nmol de apoB, hallando diferencia significativa en la condición diabética. El comportamiento electroforético, evaluado a tiempo cero mostró dos bandas pre-beta y beta, atribuibles a la tromboplastina y a la LDL respectivamente; en tanto que luego de incubar 60 min se observó una única banda intensificada de migración pre-beta que se podría atribuir a la presencia del complejo LDL - factor tisular. Son necesarios estudios clínicos que permitan evaluar los alcances de aplicación de los ensayos propuestos.

Palabras clave: factor tisular * tromboplastina * factor III * lipoproteínas de baja densidad * actividad anticoagulante * diabetes

Summary

Low-density lipoproteins (LDL) are circulating inhibitors of the pro-coagulant activity of tissue factor. The objective of the present work was to explore the electrophoretic mobility of the involved proteins and the kinetic of pro-coagulant activity inhibition, that allow us to propose a quantitative *in vitro* assay of potential clinical use. For the kinetic assay, commercial calcium thromboplastin was incubated with increasing volumes of redissolved -selectively precipitated LDL at 37 °C. Then the prothrombin time in one step was made; the inhibitory activity and percentage of inhibition against a blank were calculated. The results show an increasing inhibition of pro-coagulant activity until 60 min between 0.013 - 0.026 nmol apoB. The conditions for the assay of 30 samples of normolipemic individuals (ages between 30 - 70 years old) were selected on the basis of these results.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

The assay of % coagulation inhibition / nmol apoB showed significant differences for control group versus diabetic one. The protein electrophoresis showed two bands in pre-beta and beta positions corresponding to thromboplastine and LDL respectively at time zero. After 60 min of incubation one intense band corresponding to LDL - tissue factor complex can be observed. This work proposes a simple assay for the evaluation of LDL role in haemostatic control in pathological conditions, although further clinical assays are still required.

Key words: *tissue factor * thromboplastine * factor III * low density lipoproteins * pro-coagulant activity inhibition * diabetes*

Introducción

El factor tisular (FT) es el principal activador de la coagulación *in vivo*; su exposición a la superficie celular o su liberación desde células dañadas mediante injuria del endotelio inicia el camino extrínseco de la coagulación: se une al factor VII(a) para formar el complejo FT - FVIIa que activa a los factores IX y X para generar finalmente trombina (1). Más recientemente se le reconocen funciones adicionales en señalización celular y un rol notable en vasculogénesis y angiogénesis (2).

El efecto procoagulante del FT es restringido por inhibidores circulantes en el suero, que incluyen: *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), apoA II dentro de HDL y apoB-100 en LDL (3) (4). En el plasma el TFPI se presenta en su mayor parte asociado con lipoproteínas y en menor proporción libre nativo y truncado por acción proteolítica cercana a su carboxilo terminal (1) (3) (5).

Se ha podido establecer que la actividad inhibitoria de apoB-100 en el camino extrínseco de la coagulación se debe a la interacción directa de un dominio rico en lisina (residuos 3.147 - 3.160) con el FT. Esta asociación apoB-100 - FT enmascararía aminoácidos críticos en el FT necesarios para ligar y activar factor VII, particularmente Asp - 58, inhibiendo en consecuencia la actividad procoagulante (5-8). Esta acción, propuesta como prevalente a concentraciones fisiológicas, es complementaria de la de TFPI, que esencialmente es inhibidor específico del complejo FT - FVIIa *in situ* y del factor Xa. Actualmente se cree que la LDL sería un inhibidor del FT de acción lenta, que actuaría a continuación de la inhibición inicial por TFPI (1) (3) (7).

Por otro lado, el FT está sobreexpresado en la placa aterosclerótica (9) y puede ejercer marcado efecto procoagulante local ya que la LDL oxidada en el subendotelio habrá perdido la capacidad inhibitoria sobre la actividad del FT, conduciendo a un desequilibrio en favor de la coagulación. Las alteraciones enunciadas comprometerían el control hemostático, especialmente en condiciones asociadas con riesgo de coagulación mediado por FT como ocurre en aterosclerosis, episodios trombóticos y en *shock* endotóxico. Otras consecuen-

cias, recientemente reconocidas, incluyen formación de neointima a través de proliferación de células musculares lisas y angiogénesis (3) (9) (10).

Para evaluar el efecto inhibitorio del suero sobre el FT *in vitro* Ettore et al. (3) (7) desarrollaron una estrategia que consiste en incubar alícuotas de FT (crudo o recombinante) a 37 °C con muestras y controles hasta 2 horas y medir actividad residual coagulante por medio de un ensayo de tiempo de protrombina en una etapa o cromogénico en dos etapas. El perfil cinético de inhibición observado indica la presencia de al menos dos inhibidores en suero, identificados con anticuerpos específicos: TFPI de actividad temprana y apo-B100 de efecto más lento y prolongado (3). Esta propiedad de LDL puede verse comprometida por oxidación, proceso en el cual se forman aductos de lisina con aldehídos producidos en el mismo proceso oxidativo y alteración de estructuras secundaria y terciaria que afectarían los residuos dentro del dominio responsable de la inhibición del FT (11-14). En efecto, la expresión de actividad anticoagulante asociada con LDL, disminuye marcadamente como consecuencia del proceso oxidativo *in vitro* mediado por iones Cu⁺⁺ o por células (11) (15).

El presente trabajo propone un ensayo de medición de inhibición de la actividad de FT por lipoproteínas de baja densidad fraccionadas por precipitación selectiva; explora la cinética a distintas concentraciones de LDL y el comportamiento electroforético de las proteínas involucradas.

Materiales y Métodos

MUESTRAS

Se estudió una serie de 30 individuos de ambos sexos (entre 30 y 70 años), con niveles deseables de colesterol total y HDL, triglicéridos dentro de lo normal y colesterol-LDL cercanos, por encima, del óptimo según los criterios del Adult Treatment Panel III (ATPIII) (16) y 6 diabéticos tipo II. El suero obtenido de sangre venosa después de un ayuno de 12 horas, se conservó en heladera (2 a 10 °C) hasta 48 h.

MATERIALES

Tromboplastina cálcica comercial: Soluplastín (tromboplastina de cerebro de conejo, con 0,0125 M CaCl₂ y 0,1 M NaCl; ISI rango 1,15 - 1,25) y reactivo precipitante de LDL - colesterol (sulfato de polivinilo 10 g/mL en 25% polietilenglicol (PM 600), pH 6,7) provistos por laboratorios Wiener, Argentina. Plasma citratado normal, *pool* del día. Placas de IDR (Diffu-plate) para apoB y suero control apoA1/B provistas por Biocientífica S.A., Argentina. Acetato de celulosa gelatinizado (BioSystem, Argentina). *Buffer* Tris - barbital pH 8,8, $\mu = 0,075$. Azul brillante Coomassie R 250 (Sigma) 0,1% en solución decolorante (metanol: ácido acético: agua destilada (45:10:45 v/v)).

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico y se emplearon sin ulterior purificación.

Métodos**AISLAMIENTO DE LDL**

Se empleó el reactivo precipitante de LDL - Colesterol (Wiener, Argentina) según indicaciones del fabricante; se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con reactivo precipitante dos veces, empleando cada vez el mismo volumen que se indicó para precipitar y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. Las partículas de LDL en el precipitado se solubilizaron en una solución de NaCl 5%, empleando para tal fin el mismo volumen de suero original.

DETERMINACIÓN DE APOB POR INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Se realizó la determinación de apoB-100 en la muestra de LDL redisuelta empleando las placas de inmunodifusión radial según indicaciones del fabricante, siendo el CV intraensayo 2,7% y CV interensayo 3,8%.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se aplicó el procedimiento completo a alícuotas de la misma muestra, incluyendo la precipitación selectiva (n = 10). Los ensayos de inhibición se realizaron sucesivamente en el día, empleando para tal fin el mismo plasma citratado y reactivo de tromboplastina. Se evaluó la variabilidad del blanco (n = 10).

PRECISIÓN INTERENSAYO

Se realizaron ensayos completos independientes de precipitación e inhibición (n = 10) sobre alícuotas distintas de una misma muestra, dentro de los tiempos de estabilidad de la misma, empleando los reactivos que correspondiera cada día. Se evaluó asimismo la variabilidad del blanco (n = 10).

EFFECTO DE INTERFERENCIA POR CONTAMINACIÓN CON PRECIPITANTE

Se realizaron ensayos de inhibición de la coagulabilidad sobre diluciones del reactivo precipitante al 2,5 y 5% en solución de NaCl al 5% sin muestra.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA COAGULABILIDAD

Se incubaron 200 mL de tromboplastina cálcica comercial a 37 °C con 5, 10, 20 y 30 mL de LDL redisuelta que corresponden a 0,0065; 0,013; 0,026 y 0,039 nmoL de apoB-100 respectivamente. Al cabo de 10, 30, 60 y 90 min se determinó el tiempo de protrombina en una etapa. Las determinaciones se hicieron por duplicado y en las mismas proporciones se realizó un blanco de actividad de tromboplastina con solución de NaCl 5%.

ENSAYO DE EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA COAGULABILIDAD

Basándose en el ensayo previo, se seleccionó el tiempo de incubación (1h) y el volumen de LDL (20 μ L) para determinar la inhibición de la coagulabilidad. El ensayo se realizó en la forma descrita previamente. Se calcularon las actividades respectivas utilizando en todos los casos la tabla de actividades correspondiente al lote empleado.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición de la coagulabilidad (\% IC)} = \frac{(\text{Actividad del blanco} - \text{Actividad del redisuelto})}{\text{Actividad del blanco}}$$

Este ensayo se empleó para evaluar la capacidad inhibitoria de LDL aislada de una muestra de individuos sanos (n = 30) y pacientes con diabetes mellitus tipo II (n = 6).

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA TROMBOPLASTINA, DE LA LDL REDISUELTA Y DEL COMPLEJO LDL - FACTOR TISULAR

Se realizó una electroforesis sobre soporte de acetato de celulosa gelatinizado, *buffer* Tris - Barbital, pH 8,8, μ 0,075, durante 50 min a 1 mA / cm de ancho de tira. Posteriormente se sometieron las tiras a una coloración con solución colorante de Azul brillante Coomassie R 250 durante 10 min. Finalmente se decoloró a través de sucesivos cambios de solución decolorante.

Luego de establecer la concentración proteica total por el método de Bradford MM (17), a los fines de permitir la observación visual y guiados por las relaciones de estequiometría que surgieron del ensayo cinético, se

sembraron las siguientes cantidades de muestra: 2 μL de LDL redisuelta, 10 μL de tromboplastina cálcica y 12 μL de una mezcla a tiempo cero y otra que fue incubada durante 60 min a 37 °C, consistente en un volumen de LDL redisuelta más 5 volúmenes de tromboplastina cálcica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó por el *test* de Student y prueba F; prueba de rangos de Wilcoxon (*U* de Mann-Whitney). Los valores para $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La correlación entre parámetros se evaluó a través del coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Cuando se evaluó la precisión intraensayo, el coeficiente de variación (CV) fue de 8,4% para el procedimiento aplicado sobre la muestra y 2,1% para el blanco ($n = 10$). Los resultados obtenidos al estudiar la precisión interensayos arrojaron un CV de 12,1% para el procedimiento aplicado sobre distintas muestras y 3,3% para los distintos blancos ($n = 10$).

EFFECTO DE INTERFERENCIA POR CONTAMINACIÓN CON PRECIPITANTE

Con el fin de determinar la interferencia del agente precipitante sobre el tiempo de protrombina en una eta-

pa, se aplicó el procedimiento a dos alícuotas del mismo. Ambas dosis de agente precipitante dieron resultados idénticos en el tiempo de protrombina (17 s), siendo el del blanco de 16,5 s, lo que implicó al aplicar la ecuación, una inhibición de la coagulabilidad del 4,6% para el lote empleado. Esto muestra que el reactivo precipitante no interfiere con el ensayo de coagulabilidad.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA COAGULABILIDAD

La inhibición de la coagulabilidad es dependiente para una misma muestra del volumen de LDL empleado, así como también del tiempo de incubación, alcanzándose el máximo a los 60 min (Fig. 1). Se observa un aumento en la capacidad inhibitoria de la coagulabilidad entre 0,013 y 0,026 nmoles de apoB (10 – 20 μL de LDL respectivamente), mientras que por debajo de 0,013 nmoles de apoB no se observó inhibición. Cantidades mayores a 0,039 nmoles de apoB (correspondientes a 30 μL de LDL) presentaron 100% de inhibición de la coagulabilidad en todos los tiempos estudiados.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LA TROMBOPLASTINA CÁLCICA, DE LA LDL Y DEL COMPLEJO LDL – FACTOR TISULAR

El contenido proteico de la tromboplastina cálcica y de LDL redisuelta fue, en promedio, 1,35 g/L y 1,70 g/L respectivamente. Ambos materiales se muestran no homogéneos a la electroforesis (Fig 2, líneas a y b); siendo evidente la presencia de albúmina. En el caso de la tromboplastina, este hecho es esperable ya que se trata de un producto crudo. Por otro lado en la muestra de

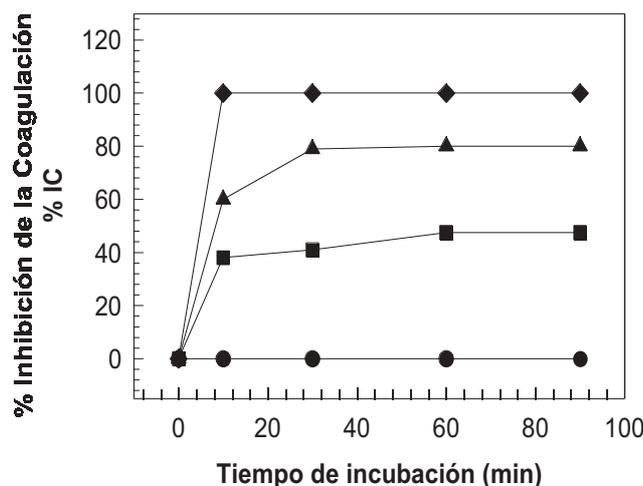


Figura 1. Cinética de la inhibición de la coagulabilidad del factor tisular por LDL aislada por precipitación selectiva.

Se incubaron 200 μL de tromboplastina cálcica comercial a 37 °C con 5 (●), 10 (■), 20 (▲) y 30 (◆) μL de LDL aislada por precipitación selectiva. Al cabo de 10, 30, 60 y 90 min se realizó la determinación de tiempo de protrombina en una etapa como se describe en la sección Materiales y Métodos.

LDL, es evidente que los lavados no fueron capaces de eliminar totalmente la impureza de albúmina que co-precipitó. En la Figura 2 (líneas c y d) se muestra claramente la formación de un complejo entre LDL aislada y el factor tisular: se observa que la banda existente a tiempo cero (línea c) desaparece al cabo de 60 min de incubación de LDL y tromboplastina (línea d).

INHIBICIÓN DEL FT POR LDL AISLADA DE CONTROLES Y PACIENTES DIABÉTICOS

En la Figura 3 se observa el porcentaje de inhibición de la coagulabilidad / nmol apoB-100 para una muestra de individuos controles (media = 2.512 ± 101,4 (n = 30)), mientras que el estudio en pacientes que padecen diabetes mellitus tipo II arrojó una media de 1.815 ± 123,9 (n = 6), siendo las diferencias estadísticamente significativas (p < 0,01), prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann - Whitney).

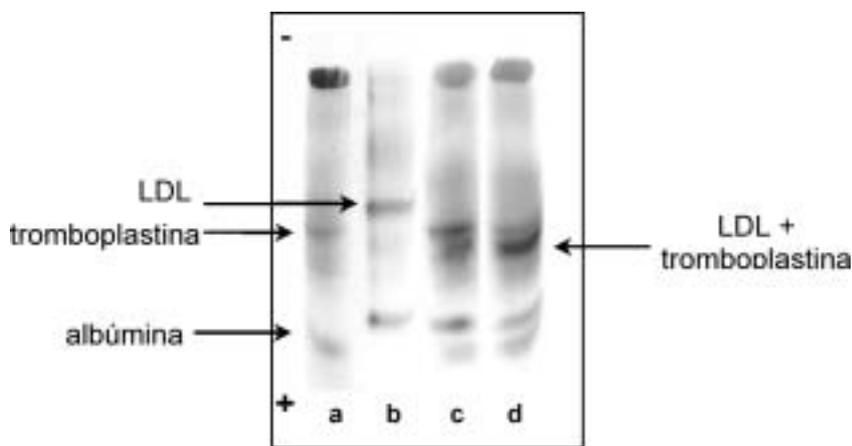


Figura 2. Estudio del comportamiento electroforético del complejo LDL - FT.

Se realizó una electroforesis en acetato de celulosa gelatinizada como se describe previamente. Se sembró: a) Tromboplastina cálcica; b) LDL; c) LDL + Tromboplastina cálcica (1 a 5 V/V), 0 min de incubación y d) LDL + tromboplastina cálcica (1 a 5 V/V), 60 min de incubación. La formación del complejo LDL - tromboplastina (d) se evidencia por desaparición de la banda correspondiente a LDL y aumento de movilidad electroforética.

La Figura 4 muestra que el porcentaje de inhibición de la coagulabilidad tiene cierto grado de correlación (r = 0,36) con el contenido de apoB en LDL redisuelta en el grupo control, no resultando significativa (p < 0,06).

Discusión y Conclusiones

Los métodos de precipitación selectiva de LDL han sido ampliamente estudiados y son de uso estandarizado en el laboratorio bioquímico clínico para medir colesterol-LDL con precisión aceptable (CV < 5%). El agente precipitante seleccionado ha sido anteriormente estudiado y demostró muy buena correlación estadística (r = 0,96) con respecto al método de referencia de fraccionamiento de lipoproteínas (ultracentrifugación), con las limitaciones reconocidas (18) (19).

Este grupo ha analizado previamente los criterios de especificidad de la precipitación lipoproteica (18). Si bien el precipitado redisuuelto luego del segundo lavado no es un producto homogéneo (demostrado por electroforesis revelada para proteínas), queda bien diferenciada la posición de la migración de LDL respecto a la banda de albúmina que la impurifica, y no genera confusión al interpretar la imagen electroforética del ensayo cinético de asociación de LDL con el FT.

El estudio del comportamiento cinético de la inhibición de la coagulabilidad a 37 °C muestra la *exhaustibilidad* de la capacidad inhibitoria, entre 0,013 y 0,026 nmol de apoB (67 y 134 mg/dL respectivamente) que están dentro del intervalo de concentraciones de niveles plasmáticos fisiológicos, así como su dependencia con el tiempo y la dosis de una misma LDL, propiedades que fueron demostradas en trabajos previos que emplean FT recombinante y apoB-100 reconstituida (6).

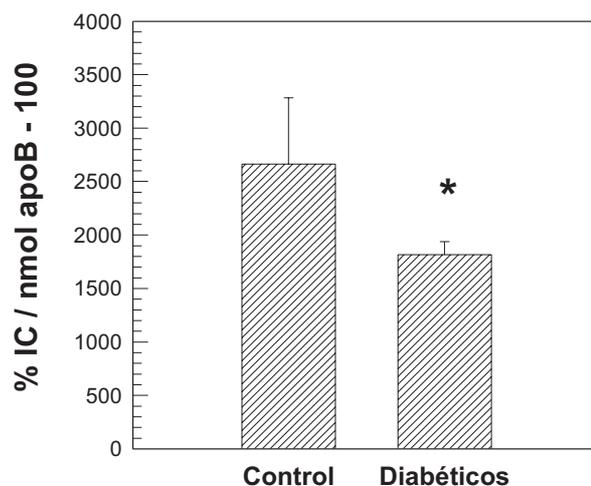


Figura 3. Inhibición de la coagulabilidad por LDL aislada de controles y pacientes diabéticos.

* p < 0,01

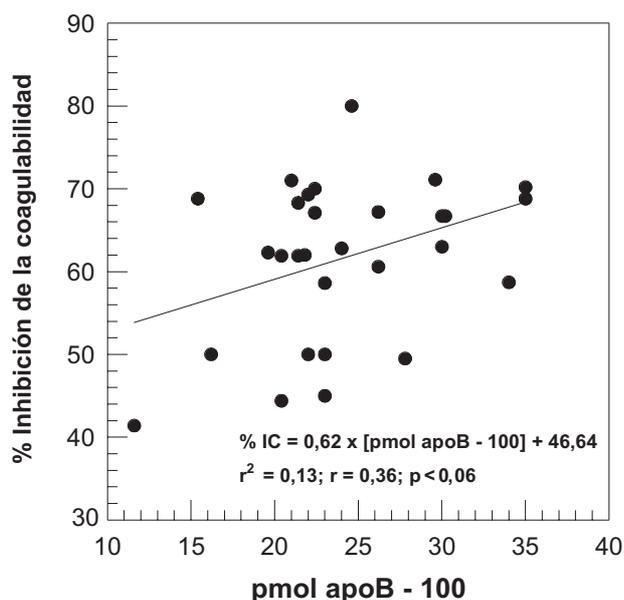


Figura 4. Correlación entre el porcentaje de inhibición de la coagulabilidad y la cantidad de apo B en la alícuota de LDL empleada (en pmoles) en el grupo control.

Si bien la tromboplastina de cerebro de conejo empleada en los presentes ensayos se muestra como un producto impuro, se admite que el empleo de FT recombinante, que es de pureza controlada, tiene la posible desventaja de carecer de las modificaciones posttraduccionales y la completa glicosilación necesarias para la obtención de actividad ideal (6). Sin embargo, ambos productos presentan el mismo espectro diferencial de la interacción con apoB-100 monitoreado a los 20 y 40 min entre 230 y 400 nm (7). Ettelaie C y col., en base a los datos espectroscópicos, interpretan que la interacción de apoB-100 y FT ocurre al menos en dos sitios: el primero implica interacciones hidrofóbicas durante los primeros 20 min de incubación, en tanto que el segundo involucra residuos con carga negativa y amino grupos libres y ocurre sobre un período de tiempo más largo (hasta 60 min) (7).

La formación del complejo LDL-FT, como se observa a través del estudio del comportamiento electroforético a los 60 min, pone también en evidencia el aumento de movilidad electroforética relativa que sufre LDL al comprometer aminoácidos básicos en la unión electrostática con el FT. La interpretación de esta experiencia es equivalente a la del seguimiento electroforético del ensayo cinético llevado a cabo por Ettelaie C y col. (7) para el FT recombinante y apoB-100 reconstituida, aunque en diferentes condiciones de corrida y soporte.

Según estos autores, la magnitud de la inhibición del FT no estaría relacionada con la cantidad relativa de LDL presente, sino con su diferente composición,

haciéndose evidente a partir de la observación de la declinación de su acción por efecto de oxidación de la partícula de LDL (3). Este hecho podría relacionarse con el factor de determinación entre %IC y la cantidad de apoB hallada en el presente trabajo, que sugiere una fuerte influencia de la calidad de la apo B de cada muestra, ya que sólo permite estimar un 13% de la variabilidad de %IC cuando se conoce la cantidad de apoB. En este sentido, el presente trabajo avala el concepto enunciado a través de la diferencia significativa hallada entre individuos sanos y diabéticos en el cociente %IC/nmol de apoB. Así, la disminución de la coagulabilidad podría atribuirse al grado de glicación presente en la molécula de apoB.

Diversos estudios atribuyen un rol al incremento del *pool* circulante de FT en enfermedades aterotrombóticas, en particular, aquellas relacionadas con ciertos factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión, diabetes, hiperlipemia y el hábito de fumar (20) (21). Estudios recientes han sugerido funciones adicionales no trombogénicas del FT en la formación de tejido neovascular; como ejemplos: crecimiento y metástasis de tumores, ruptura de la placa aterosclerótica y retinopatía secundaria a la diabetes (2) (22) (23). La asociación con LDL afectaría ambas funciones trombogénicas y no trombogénicas. Sin dejar de enfatizar la utilidad de la evaluación tradicional en el establecimiento del riesgo cardiovascular global en los pacientes, el índice propuesto (% de IC / nmol apoB) abriría el camino para explorar desde el laboratorio clínico el compromiso de la LDL sérica en procesos patológicos asociados con FT. Los resultados presentados en este trabajo sugieren un compromiso de la LDL sérica sobre el control de la hemostasia a través del FT, en particular en pacientes diabéticos.

Las expectativas clínicas planteadas enfatizan la necesidad de disponer de estandarización rigurosa de los métodos para que la interpretación sea confiable. La metodología empleada en el presente trabajo responde a las exigencias de evaluación analítica y es posible llevarla a cabo en un laboratorio bioquímico clínico de baja complejidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Ana María Cortizo por la lectura crítica del manuscrito y a Laboratorios Wiener, Argentina y Biocientífica S.A., Argentina, por la gentil donación de reactivos.

CORRESPONDENCIA

DRA. ADRIANA ELENA SCOCCIA
Cátedra de Bioquímica Patológica
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
47 y 115. 1900 LA PLATA, Prov. de Bs. As., Argentina
E-mail: ascoccia@netverk.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis. Kordich L. Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. Capítulo: inhibidores fisiológicos de la coagulación. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; Argentina; 2003.
2. James NJ, Ettelaie C, Bruckdorfer KR. Inhibition of tissue factor activity reduces the density of cellular network formation in an *in vitro* mode of angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 217-21.
3. Ettelaie C, Wibourn BR, Adam JM, James NJ, Bruckdorfer KR. Comparison of the inhibitory effects of apoB-100 and tissue factor pathway and the influence of lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb* 1999; 19: 1784-90.
4. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-3.
5. Hansen JB, Huseby NE, Sandset PM, Svensson B, Lyngmo V, Nordoy A. Tissue factor pathway inhibitor and lipoproteins: evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 223-9.
6. Ettelaie C, James NJ, Adam JM, Nicola KP, Wilbourn BR, Bruckdorfer KR. Identification of a domain in apolipoprotein B-100 that inhibits the procoagulant activity of tissue factor. *Biochem J* 1998; 333: 433-8.
7. Ettelaie C, James NJ, Wilbourn BR, Adam JM, Naseem KM, Bruckdorfer KR. The mechanism of inhibition of factor III (thromboplastin) activity by apolipoprotein B-100. *Arterioscler Thromb* 1996; 16: 639-47.
8. Ettelaie C, Howell RM. The inhibition of thromboplastin by apolipoprotein B and the effect of various lipids. *Thromb Res* 1992; 68: 175-84.
9. Lesnik P, Dentan CH, Vonica A, Moreau M, Chapman MJ. Tissue factor pathway inhibitor activity associated with LDL is inactivated by cell-and copper-mediated oxidation. *Arterioscler Thromb* 1995; 15: 1121-30.
10. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.
11. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 341-90.
12. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance [minireview]. *J Biol Chem* 1997 (34): 20963-6.
13. Ettelaie C, Howell RM, Bruckdorfer KR. The effect of lipid peroxidation and lipolysis on the ability of lipoproteins to influence thromboplastin activity. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1257: 25-30.
14. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 (8): 2839-43.
15. Sandset PM, Lund H, Norseth J, Abilgaard U, Ose L. Treatment with hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in hypercholesterolemia induces changes in the components of the extrinsic coagulation system. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 138-45.
16. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
18. Scoccia AE, Molinuevo MS, Cortizo AM. Determinación de ácido siálico sobre lipoproteínas de baja densidad aisladas por precipitación selectiva. Propuesta de índices de composición. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2003; 37 (2): 145-51.
19. Demacker PN, Hijmans AG, Brennink Meijer BJ, Hansen AP, van't Laar A. Five methods for determining low density lipoprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30 (11): 1979-80.
20. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, *et al.* Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003; 107 (7): 973-7.
21. Felmeden DC, Spencer CG, Chung NA, Belgore FM, Blann AD, Beevers DG, *et al.* Relation of thrombogenesis in systemic hypertension to angiogenesis and endothelial damage/dysfunction (a substudy of the Anglo-Scandinavian cardiac Outcomes Trial [ASCOT]) 2003; 92 (4): 400-5.

Aceptado para su publicación el 16 de diciembre de 2005

