

Sistema de Coagulación

Alejandra Scazziota. Profesora Adjunta Hemostasia. Dpto de Bioquímica Clínica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A

La hemostasia es el conjunto de sistemas que actúan coordinadamente para mantener la integridad de los vasos sanguíneos y la fluidez de la sangre. Estos sistemas encargados de mantener el balance hemostático son el vascular, el plaquetario, el de coagulación y el de fibrinólisis. La alteración de cualquiera de ellos puede desencadenar trastornos tromboticos o hemorrágicos dependiendo de la naturaleza de la falla.

Cuando se produce una injuria intrínseca o extrínseca de un vaso sanguíneo ocurren una serie de eventos simultáneos que tienden a formar el tapón hemostático. Ante una lesión endotelial, los primeros en reaccionar son el sistema vascular y las plaquetas, el endotelio responde con una vasoconstricción local que limita el flujo de sangre en la zona lesionada, se exponen a la sangre las moléculas adhesivas del subendotelio como colágeno, factor von Willebrand, fibronectina, vitronectina, laminina y otras proteínas que favorecen la adhesividad y la agregación plaquetaria y conducen en primera instancia a la formación de un tapón plaquetario. Las plaquetas activadas liberan más agonistas como ADP, tromboxano A₂, serotonina, adrenalina, que exacerbaban el proceso de agregación plaquetaria. La lesión endotelial provoca también la exposición del factor tisular desde el subendotelio, que activa el mecanismo de coagulación y lleva a la formación de trombina. Ésta a su vez, activa a nuevas plaquetas y consolida la malla de fibrina alrededor del tapón plaquetario, contribuyendo a la formación de un verdadero tapón hemostático. Al mismo tiempo la liberación endotelial de activadores del sistema fibrinolítico conduce a la formación de plasmina que pone un freno al crecimiento de la malla de fibrina, evitando la formación de un trombo pero manteniendo el deseado equilibrio de prevenir a la vez trombosis y hemorragia. Manteniendo esta compleja interrelación entre las propiedades pro y anticoagulantes de la sangre y de los vasos sanguíneos, el organismo es capaz de mantener la integridad vascular y la fluidez de la sangre. ⁽¹⁾

Los sistemas de coagulación y fibrinólisis son estructuralmente muy similares ya que pueden ser activados por un mecanismo intrínseco y/o extrínseco para producir una enzima activa y en ambos, un conjunto de inhibidores son capaces de equilibrar y limitar el proceso. Mientras que en la coagulación la trombina es la enzima central que deriva de una proteína inactiva circulante en el plasma, la protrombina; en la fibrinólisis la enzima es la plasmina que deriva del plasminógeno plasmático. La trombina es capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina y si su acción no es limitada por los inhibidores fisiológicos, se puede producir un fenómeno trombotico, por el contrario si hay un retardo en la producción de trombina existe una tendencia a la hemorragia. La plasmina, en cambio, degrada al fibrinógeno y a la fibrina, si hay un defecto de inhibidores fibrinolíticos la patología clínica más frecuente es la hemorragia, pero una producción de plasmina más lenta puede desencadenar una trombosis.

El Sistema de Coagulación

El sistema de coagulación está formado por un conjunto de proteínas que circulan en la sangre como zimógenos que cuando son activados se convierten en proteasas con sitio activo Serina o serino proteasas, que funcionan en cadena para formar la malla de fibrina que estabiliza el tapón hemostático. El sitio activo de estas proteasas es en realidad una triada de aminoácidos formada por Serina, Histidina y Acido aspártico que si bien están separados en la estructura primaria, se encuentran muy cercanos en la estructura cuaternaria de la proteína.

La interpretación del proceso de coagulación en cascada ha sido publicada casi al mismo tiempo, en 1964, por MacFarlane ⁽²⁾ en Oxford y por Ratnoff y Davie ^(3,4) en Washington, y ha sido de gran utilidad durante muchos años para empezar a entender el complejo proceso de la formación del trombo. Según estos investigadores, el mecanismo de coagulación se interpreta como una cascada enzimática en la que se distinguen dos vías, la extrínseca iniciada por la exposición del Factor Tisular a partir de una lesión del tejido y la vía intrínseca, que se activa por contacto de la sangre con determinadas superficies. Ambas vías convergen para activar al Factor X y continuar juntas el proceso de transformación de la protrombina en trombina y, a través de la trombina convertir el fibrinógeno en fibrina. Estos dos sistemas de activación tienen interacciones y retroalimentaciones positivas y negativas entre ellos que lo hacen un sistema complejo. Actualmente el concepto de la activación en cascada ha sido reemplazado por una activación simultánea de los factores de coagulación sobre una superficie celular, con una activa participación de la plaqueta en la amplificación del proceso de coagulación. No obstante ello, con fines didácticos describiremos la activación de la coagulación por dos caminos por separado con una vía final común, tal como lo describiera MacFarlane. (Figura 1)

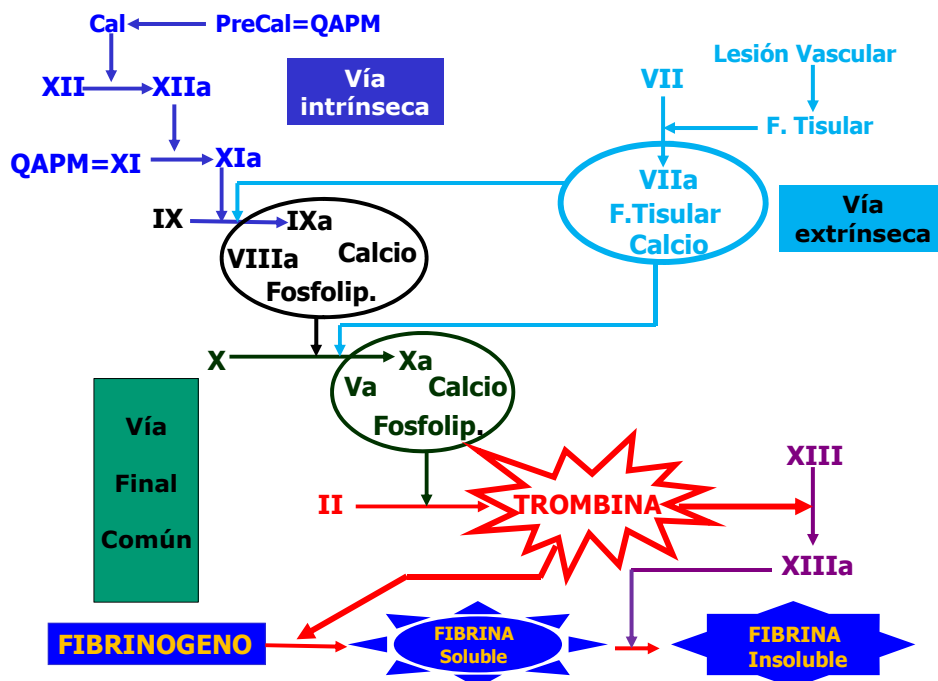


Figura 1: Esquema de la cascada de coagulación. En la vía intrínseca se distinguen la fase de contacto (color azul) y el complejo tenasa (color negro). La vía extrínseca (color celeste) y en la vía final común, el complejo protrombinasa (color verde). Cal: calicreínas; PreCal: precalicreínas; QAPM: quininógenos de alto peso molecular.

La **activación intrínseca de la coagulación** se inicia con la llamada fase de contacto, en la que intervienen el Factor XII (FXII) o Factor Hageman, las precalicreínas y el Factor XI (FXI), que son serinoproteasas y los quininógenos de alto Peso Molecular, que son cofactores de la reacción. Cuando estos factores se combinan con una superficie cargada negativamente, el FXII sufre un cambio conformacional en su molécula que desencadena un mecanismo de autoactivación. ^(5,6)

El FXII activado (FXIIa) produce la conversión de precalicreínas en calicreínas y activa al FXI a FXI activado (FXIa). Las calicreínas a su vez activan más FXII estableciendo una cascada de activación recíproca. De esa manera potencian su propia activación en una reacción que se amplifica varias veces y conduce finalmente a la formación de suficiente cantidad de FXIa. ^(7,8) (Figura 2). Por otro lado las calicreínas producen un clivaje en los quininógenos de alto peso



Figura 3: Estructura del Factor IX. Proteína de cadena única compuesta por: un Péptido señal que conduce a la proteína al Retículo Endoplásmico, un Propéptido que es reconocido por la carboxilasa, un Dominio GLA donde 10 a 15 aminoácidos reciben los grupos gamma carboxi glutámico extra, dos dominios EGF1 y EGF2, semejantes al factor de crecimiento epidérmico, un Péptido de activación que se libera cuando el zimógeno es clivado por el FXIa, un Dominio catalítico con la triada Serina-Histidina-Aspartico ubicados en los aminoácidos 41, 89 y 185

El FIXa resultante de esta reacción cliva al Factor X (FX) que está formado por dos cadenas polipeptídicas unidas por puente disulfuro y tiene un peso molecular de 58,8 kD. (Figura 4). El clivaje ocurre en una unión peptídica Arginina51–Isoleucina52 en la cadena pesada, liberándose un péptido de activación altamente glicosilado que permanece asociado no covalentemente con el FXa. ⁽¹¹⁾ Para que esta etapa ocurra de manera eficiente se requiere la formación del complejo que se denomina tenasa y está constituido por FVIIIa, FIXa, FX y Ca^{2+} ensamblados sobre la superficie de plaquetas activadas que exponen fosfatidilserina y fosfatidilinositol. (Figura 5) Estos factores se unen a los fosfolípidos de membrana a través sus residuos gamma carboxiglutámicos, así la reacción ocurre eficientemente sobre una matriz sólida.

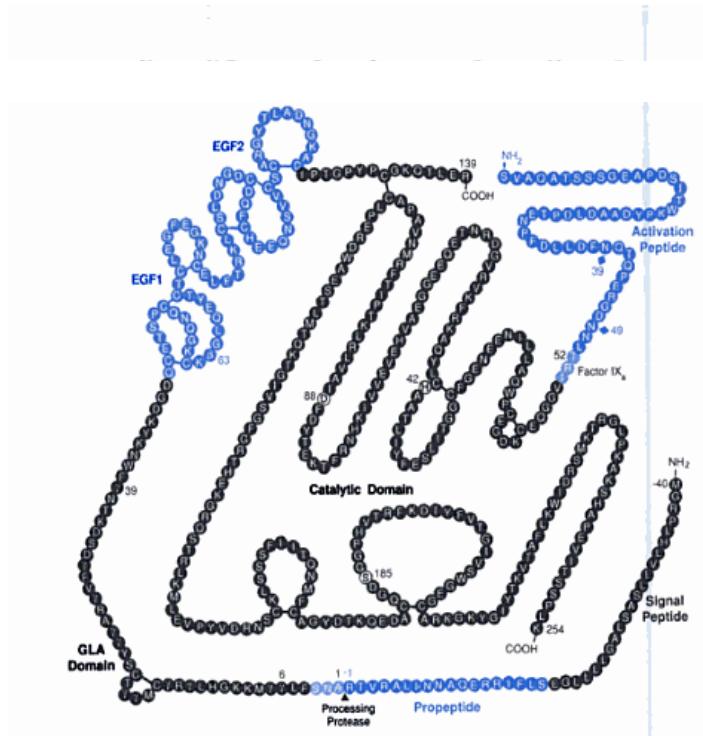


Figura 4: Estructura del Factor X. Proteína de doble cadena, unidas por puente disulfuro. La cadena liviana está compuesta por: un Péptido señal que conduce a la proteína al Retículo Endoplásmico, un Propéptido que es reconocido por la carboxilasa, un Dominio GLA donde 10 a 15 aminoácidos reciben los grupos γ carboxi glutámico extra, dos dominios EGF1 y EGF2 semejantes al factor de crecimiento epidérmico. En la cadena pesada se distingue: el Péptido de activación que se libera cuando el zimógeno es clivado por el FIXa y el Dominio catalítico con la triada Serina-Histidina-Aspartico ubicados en los aminoácidos 185, 42 y 88.

En el complejo tenasa, el Factor VIII (FVIII) es el cofactor que acelera la velocidad de la reacción unas 1000 veces, la trombina, en pequeñas cantidades y el FXa incrementan la actividad del FVIII, constituyendo otro ejemplo de retroalimentación positiva. Pero si la concentración de trombina aumenta, el FVIII activado (FVIIIa) puede ser clivado e inactivado indirectamente por la misma trombina que además de su potente actividad procoagulante, posee una actividad anticoagulante compensatoria a través de la Proteína C que es un inhibidor fisiológico de la coagulación activado por trombina. Este es un ejemplo de la acción dual de la trombina sobre la cascada, activando y en otros puntos inhibiendo la actividad de los factores de coagulación.

La activación del FX a FXa es el punto común de ambas vías de activación, la intrínseca y la extrínseca, a partir de allí continúa lo que llamamos vía final común.

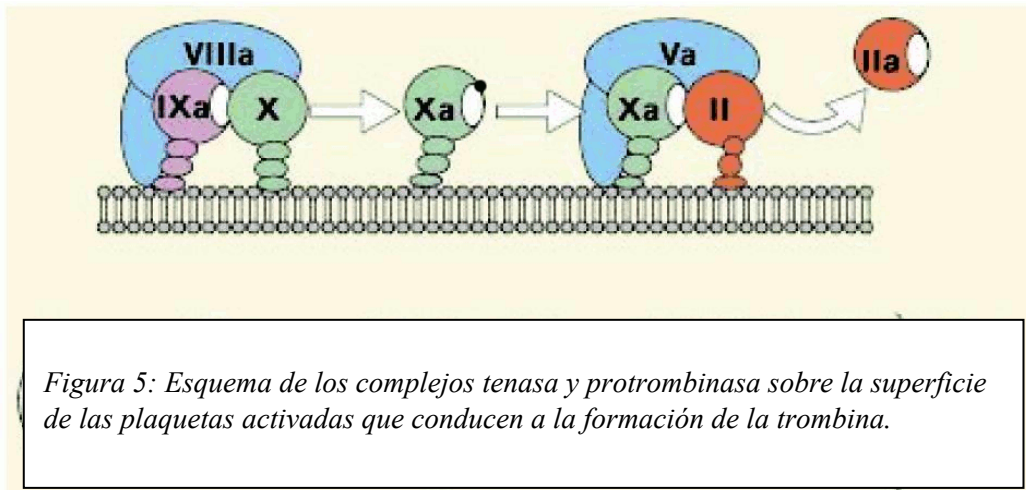


Figura 5: Esquema de los complejos tenasa y protrombinasa sobre la superficie de las plaquetas activadas que conducen a la formación de la trombina.

Como ya hemos mencionado, la separación del sistema de coagulación en vías intrínseca y extrínseca es arbitraria y como veremos más adelante la activación en cascada no es lo que realmente ocurre in vivo. Por otra parte lo que llamamos vía de activación intrínseca tiene menor significancia in vivo que la vía extrínseca, sin embargo en ciertos estados patológicos, esta activación puede ocurrir in vivo, por ejemplo cuando el colágeno del subendotelio se expone frente a una lesión del endotelio o ante la presencia de complejos antígeno-anticuerpo o endotoxinas. También ocurre esta activación cuando la sangre se expone a superficies artificiales por ejemplo en intervenciones quirúrgicas o en pacientes portadores de válvulas protésicas cardíacas ⁽¹²⁾. También las partículas lipoproteicas, VLDL y quilomicrones pueden activar esta vía, poniendo de manifiesto el papel de la hiperlipemia en la generación de un estado protrombótico en el desarrollo de la aterosclerosis. La activación intrínseca se observa también in vitro en las pruebas de coagulación que se fundamentan en la activación por contacto, como ocurre con el tiempo de coagulación cuando la sangre se contacta con las cargas negativas del tubo de vidrio o con el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (APTT) por el contacto con las cargas negativas del activador del reactivo (caolín, celite, ácido elágico).

La vía extrínseca de la coagulación se inicia por el contacto de la sangre con el Factor Tisular (FT) expuesto a partir de una injuria en el tejido. El FT es una glicoproteína de la superficie de la célula subendotelial que se encuentra también en los monocitos, los macrófagos, en el tejido extravascular, especialmente en la adventicia, en el epitelio y las mucosas, en los astrocitos del cerebro y en las células del endometrio. Tiene un peso molecular de 47 kD y está constituido por 263 aminoácidos organizados en tres dominios: uno extravascular, uno transmembrana y uno intracelular que tienen 219, 23 y 21 aminoácidos cada uno respectivamente. El FT se encuentra disponible en la cara apical de las células endoteliales vasculares, por ello cuando las células endoteliales han sido suficientemente dañadas o estimuladas, expresan el FT que puede interactuar tanto con el FVII activado (FVIIa) como con el FVII zimógeno (FVII). Muchas de las proteasas producidas durante la coagulación, FIXa, FXa, FXIIa y trombina, son capaces de activar al FVII, pero su grado de activación depende fundamentalmente de la concentración de FT presente en la lesión vascular.

El FVII tiene un PM de 50 kD y está formado por una cadena polipeptídica. Como todos los factores vitamina K dependientes, el FVII posee en su molécula un dominio N-terminal γ -carboxyglutámico, seguido por dos dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico, tal como ocurre en los factores IX y X, ⁽¹³⁾ y un dominio serino proteasa en la porción C-terminal. (Figura 6) El pasaje a FVIIa se produce por el clivaje de la unión Arginina-Isoleucina en la posición 152 que lo transforma en una molécula de dos cadenas unidas por puente disulfuro, una liviana 152 aminoácidos a partir del extremo amino terminal y una pesada de 254 aminoácidos que posee el sitio activo, en el extremo carboxi terminal. ⁽¹⁴⁾

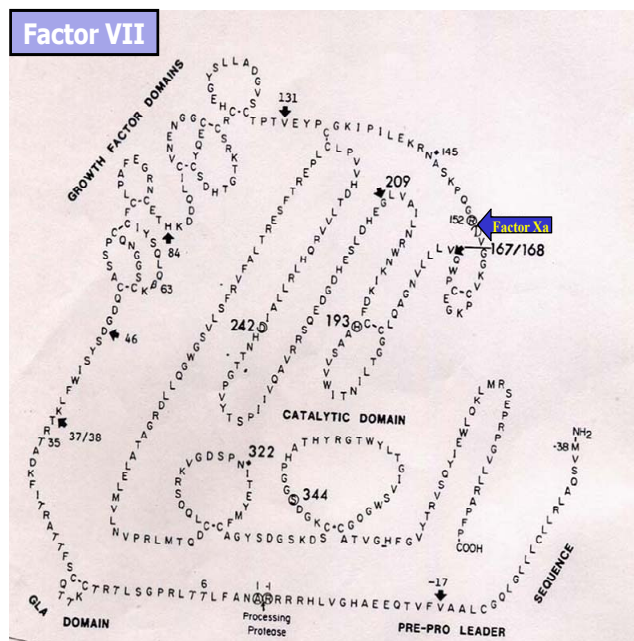


Figura 6: Estructura del Factor VII. Proteína de cadena única compuesta por: un Péptido señal, un Propéptido, un Dominio GLA donde 10 a 15 aminoácidos reciben los grupos γ carboxi glutámico extra, dos dominios EGF1 y EGF2 semejantes al factor de crecimiento epidérmico, un Dominio catalítico con la triada Serina-Histidina-Aspartato ubicados en los aminoácidos 344, 193 y 242. La flecha azul muestra el sitio de clivaje por el FXa.

El FVIIa y su cofactor el FT, pueden combinarse sobre las superficies fosfolipídicas para formar la tenasa extrínseca que cataliza la conversión tanto del FX como del FIX a sus formas activadas. (Figura 1). El FXa resultante puede, a su vez, activar al FVII. Esta activación del FXa sobre el FVII genera una conexión entre las vías intrínseca y extrínseca, que también están ligadas por la activación del complejo TF-FVIIa sobre el FIX.

La síntesis de FVII puede ser inducida por endotoxinas, inmunocomplejos, trombina, Interleuquina 1 y factor de necrosis tumoral. Se ha postulado en trabajos más recientes que el FVIIa que circula en el plasma provendría de la acción de una serino proteasa llamada proteasa activadora del FVII, que no sólo es un potente activador del FVII sino también de la prouroquinasa de cadena simple que es activadora del plasminógeno. Este hecho actuaría como disparador de la coagulación y de la fibrinólisis al mismo tiempo. Esta proteasa tiene gran afinidad por los glicosaminoglicanos por lo que estaría implicada en eventos proteolíticos extracelulares, además se la encuentra en las placas ateroscleróticas inestables y por su acción tanto sobre coagulación, como sobre la fibrinólisis, se piensa que podría contribuir a la inestabilidad de la placa. (15, 16)

El FVIIa es uno de los pocos factores que puede encontrarse en el plasma en su forma activada debido a la alta glicosilación de la molécula, en general las formas activadas de los factores de coagulación tienen una vida media extremadamente corta ya que una vez activados son degradados por el Sistema Retículo Endotelial. Aproximadamente el 1% del FVII plasmático se encuentra en circulación en su forma activada proveniente del zimógeno que fue escindido en la Arginina 152 para dar lugar al FVIIa, pero su centro activo se expresa eficientemente sólo cuando el FVIIa se une al FT.

Además de desencadenar la activación de la coagulación, la interacción del FVIIa con el FT, también induce señales que regulan el comportamiento celular por activación de las proteínas G asociadas con los receptores de proteasas activadas (PARs). (17)

El FT también se expresa en las lesiones ateroscleróticas y está involucrado en la formación del trombo asociado con la ruptura de la placa, así puede actuar en el proceso proliferativo asociado con la reestenosis, posiblemente atribuible a la generación local de trombina en la íntima. Como los macrófagos sintetizan FVII, los que se encuentran dentro de la lesión aterosclerótica pueden aportar el factor y llevar a una activación parcial de la coagulación al unirse con el FT allí presente.⁽¹⁸⁾ Mediante metodología de PCR (reacción de polimerasa en cadena) se ha confirmado la presencia de RNAm de FVII en los vasos normales y en los ateroscleróticos, en las células musculares lisas, fibroblastos y keratinocitos.⁽¹⁹⁾

El único mecanismo inhibitorio hasta ahora conocido de esta vía, actúa a nivel del complejo TF/FVIIa/FXa y está a cargo de una lipoproteína llamada tissue factor pathway inhibitor, TFPI. Este inhibidor está compuesto por 3 dominios inhibitorios que se denominan kunitz: el kunitz 1 se une al FXa y el kunitz 2 se une al FVIIa/FT sólo si el FXa está presente. La inhibición del TFPI sobre el complejo de la vía extrínseca ocurre in situ sobre la matriz fosfolipídica donde los factores VIIa y Xa están unidos a través de sus residuos gamma carboxiglutámicos.⁽²⁰⁾ Tan importante es la regulación que el TFPI ejerce sobre esta vía de activación que se piensa que su déficit es incompatible con la vida.

Si bien en los comienzos se pensaba que la vía intrínseca era la más importante in vivo, distintas evidencias fueron demostrando que el paso fundamental en la activación de toda la cascada de coagulación es la formación del complejo FVIIa-TF.^(21,22) A partir de este concepto se comenzó a hablar de la “cascada revisada de la coagulación” o más aún de la “nueva cascada de coagulación”^(23,24) que coloca en segundo plano a la fase de contacto de la vía intrínseca.

Tanto la activación de la vía extrínseca como la intrínseca convergen en un punto común que es la activación del FX a FXa. A partir de allí se siguen sucediendo activaciones en lo que se denomina la **Vía Final Común**. El FXa formado ya sea en forma rápida por el complejo FT/FVIIa, o de forma más lenta por el complejo FIXa/FVIII, activa a la protrombina (Factor II) a trombina (Factor IIa). Esta activación requiere la formación del complejo protrombinasa constituido por fosfolípidos aportados por las plaquetas activadas (fosfatidil inositol y fosfatidil serina), Calcio, FVa, FXa, y protrombina. El FVa se une a receptores específicos de la membrana de las plaquetas y actúa como cofactor, similar al FVIII en el complejo tenasa intrínseca y también como éste, es activado por pequeñas cantidades de trombina.

La protrombina es una proteína de 72 Kd, de cadena simple que contiene 10 residuos gamma carboxi glutámicos en su región N-terminal por los que se fija a los fosfolípidos de las membranas, contiene dos estructuras homólogas llamadas kringles ubicadas entre los residuos 40 y 270 y a continuación un dominio proteasa compuesto por las cadenas A y B. La proteína madura circula en plasma como un zimógeno y es activado mediante clivajes a nivel de las uniones Arginina273-Treonina274 y Arginina323-Serina324 que conduce a la formación de trombina y un fragmento que se denomina Fragmento 1+2. (*Figura 7*)

En condiciones fisiológicas el clivaje ocurre principalmente en la unión de la Arginina 323-Serina324 que separa el extremo carboxi terminal en dos cadenas A and B (B tiene el sitio catalítico) y forma el intermediario activo meizotrombina.⁽²⁵⁾ Si el clivaje ocurre primero en arginina 271, genera el precursor inactivo, pretrombina-2 y el fragmento 1+2 (esquemático como Gla-K1-K2 en la *Figura 8*). Cualquiera de los dos precursores puede sufrir un clivaje posterior para formar la trombina que es una molécula de dos cadena unidas por puente disulfuro. Finalmente esta proteasa acelera el proceso de coagulación ya que convierte al fibrinogeno en fibrina y activa a los factores XI, VIII, V y XIII⁽²⁶⁾ además de activar a las plaquetas

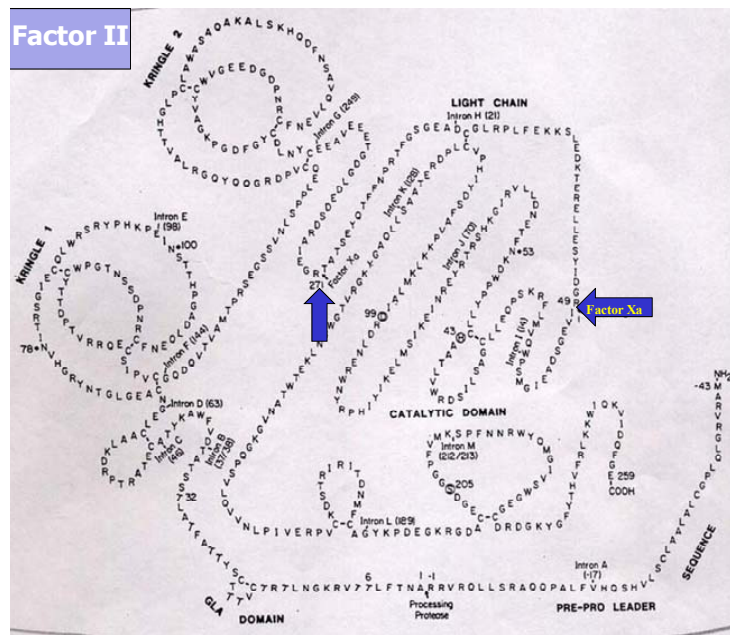


Figura 7: Estructura del Factor II. Proteína de cadena única compuesta por: un Péptido señal, un Propéptido, un Dominio GLA donde 12 aminoácidos reciben los grupos γ y carboxi glutámico extra, dos Kringles 1 y 2, un Dominio catalítico con la triada Serina-Histidina-Aspártico. La flecha azul muestra los dos sitios de clivaje por el FXa.

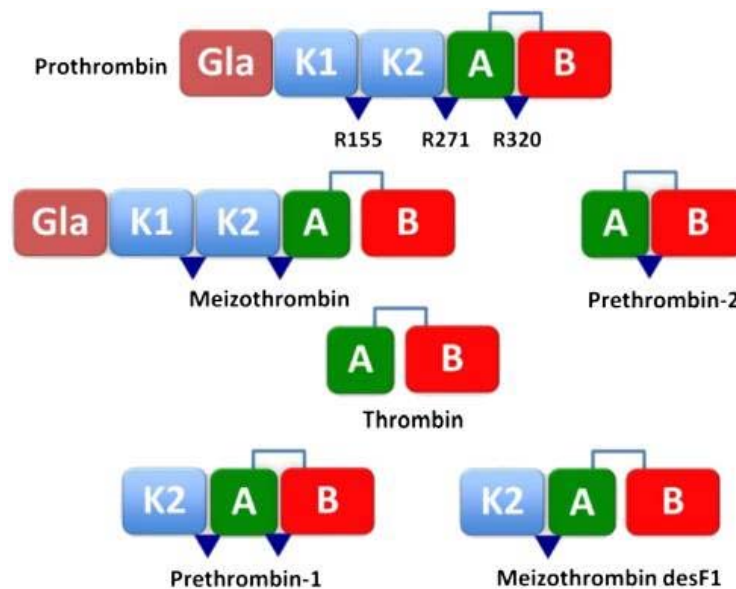


Figura 8: Representación esquemática de la activación de la protrombina. GLA: dominio γ carboxi glutámico. K1 y K2 dominio Kringle. A y B representan las cadenas en que se divide el extremo carboxi terminal por el clivaje producido por el FXa. (Extraído de *Blood: principles and practice of hematology*, Robert Handin, Samuel Lux, Thomas Stossel)

El fibrinógeno es una proteína dimérica cuyos monómeros se mantienen unidos por puentes disulfuro en la zona cercana al amino terminal. Cada monómero está constituido por tres cadenas: una α , una β y una γ enrolladas en alfa hélice. De acuerdo con su estructura terciaria podemos considerar en el fibrinógeno la existencia de tres dominios: el nódulo central

constituye el dominio correspondiente a los extremos amino-terminales (dominio E) y a los laterales se hallan los dominios correspondientes a los extremos carboxi-terminales (dominios D) unidos al central por las cadenas polipeptídicas enrolladas. Los fibrinopéptidos A y B ubicados en el dominio central E, poseen residuos de ácido glutámico y ácido aspártico que le confieren una alta densidad de carga negativa, que produce repulsión entre las moléculas de fibrinógeno. (Figura 9)

Cuando la trombina actúa sobre el fibrinógeno y escinde la unión Arginina16-Glicina17 en el extremo amino-terminal liberando el péptido A de la cadena α , y posteriormente el péptido B de la β por el clivaje Arginina14-Glicina15, se pierden las cargas negativas y se forman los monómeros de fibrina que se asocian entre sí por uniones electrostáticas débiles para formar el polímero de fibrina.⁽²⁷⁾

Finalmente la trombina convierte al Factor XIII (FXIII) en FXIIIa. Este factor no es una serino proteasa sino que tiene actividad transglutaminasa, que cataliza el entrecruzamiento entre las cadenas de los monómeros de fibrina. (Figura 10) Se lo denomina factor estabilizante de la fibrina ya que su principal función es establecer uniones covalentes en el polímero de fibrina soluble, mediante reacciones de transamidación entre el grupo amida de la glutamina de una cadena γ y el grupo ϵ -amino de la lisina de otra cadena γ , originando una estructura más estable y resistente a la acción proteolítica del sistema fibrinolítico. Además el FXIII es capaz de establecer enlaces entrecruzados adicionales entre cadenas α - α y α - γ de los monómeros, y cadenas α de los monómeros con la α_2 antiplasmina o con la fibronectina, aumentando la resistencia de la malla de fibrina. Las cadenas γ de la fibrina también se entrecruzan con la integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$ favoreciendo la retracción del coágulo.

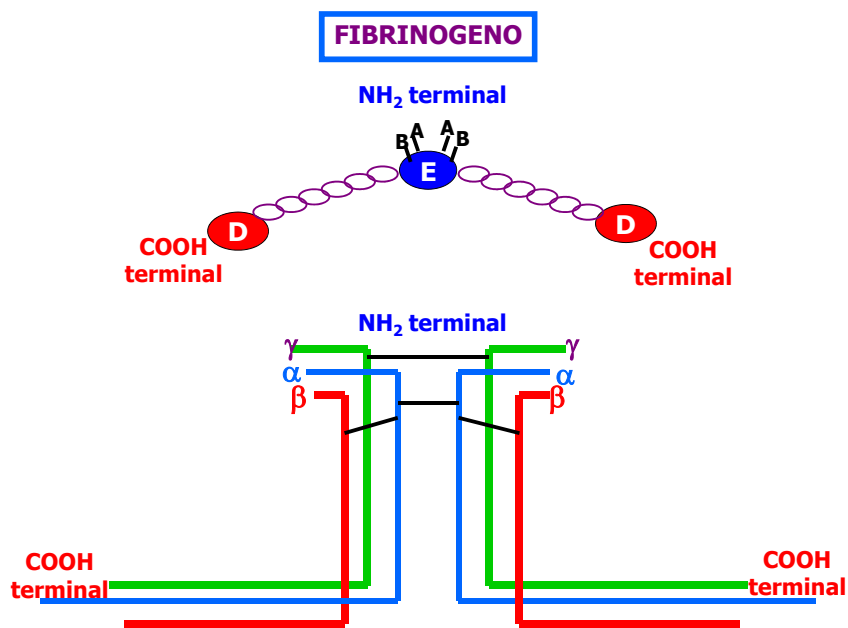


Figura 9: Representación esquemática de la molécula de fibrinógeno. Arriba: esquema de los dominios D carboxi terminales y el dominio E amino terminal. Abajo: Esquema de la molécula en forma de dímero, cada uno formado por cadenas α , β , γ .

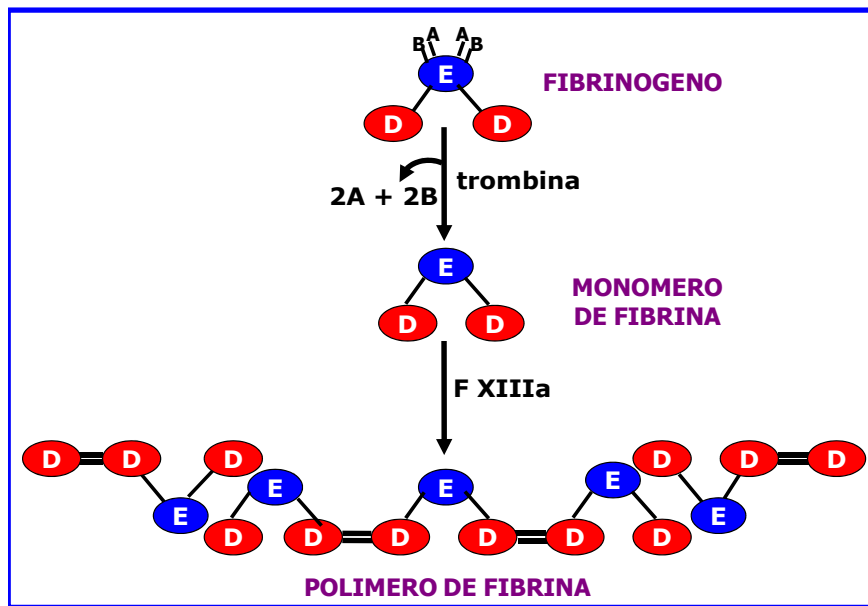


Figura 10: Representación esquemática de la formación de la malla de fibrina

El FXIII circula en plasma como un hetero-tetrámero formado por dos subunidades A y dos B, (A₂B₂) ⁽²⁸⁾. Las subunidades A son sintetizadas en los megacariocitos y en los precursores monocíticos en la médula ósea, así como en la placenta, por ello esta subunidad se encuentra en plaquetas, monocitos, macrófagos, células dendríticas, condrocitos, osteoblastos y osteocitos; las subunidades B, en cambio, son de síntesis hepática. El tetrámero se ensambla en el plasma donde tiene una prolongada vida media de 7 a 14 días y en gran parte circula unido a la cadena γ del fibrinógeno a través de la subunidad B. La activación del FXIII es iniciada por la trombina que cliva un péptido de activación de cada una de las subunidades A, posteriormente en presencia de Calcio se disocian las subunidades B, y se producen cambios conformacionales que lo transforman en transglutaminasa activa (FXIIIa). Esta activación es acelerada en presencia de fibrinógeno/fibrina ⁽²⁹⁾. Además de su función en la hemostasia, el FXIII tiene múltiples funciones plasmáticas e intracelulares, como su función en el mantenimiento del embarazo facilitando el implante placentario, en la cicatrización de heridas, también se le adjudican funciones proangiogénicas cardioprotectoras y en el desarrollo del cartílago y del hueso. ⁽³⁰⁾

La máxima generación de trombina ocurre después de formarse el coágulo de fibrina, ello colabora para generar más cantidad de fibrina y más activación del FXIII. Pero debemos notar que esa misma trombina, activa también a un inhibidor fibrinolítico, el TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina) que limita la acción de la plasmina sobre el coágulo consolidado.

Además de sus actividades procoagulantes, la trombina juega un papel regulatorio muy importante ya que cuando se combina con la trombomodulina presente en la superficie de la célula endotelial, forma el complejo trombina/trombomodulina que convierte la Proteína C en Proteína C activada. La Proteína C es un inhibidor fisiológico de la coagulación, que en presencia de la Proteína S que actúa como cofactor de la reacción, degrada a los factores Va y VIIIa. De esta manera limita la actividad de estos dos factores de coagulación, así es la misma trombina la que pone freno a su propia formación, además de modular la fibrinólisis por activación del TAFI. ⁽³¹⁾

La trombina también se une a los receptores PARs (receptores activados por proteasas), específicamente PAR-1, 3 y 4 que están acoplados a proteínas G. Los PARs convierten el resultado de un clivaje proteolítico extracelular en la activación de varias señales intracelulares. La cascada de señales desencadenadas por los PARs activados por trombina desencadenan un fuerte efecto proinflamatorio con liberación de interleuquinas 1 y 6, secreción de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1), en general

aumentan la expresión de proteínas de superficie que incrementan la extravasación de leucocitos y la activación plaquetaria. ⁽³²⁾

En la cascada de coagulación se producen varios mecanismos de retroalimentación que regulan el balance entre zimógenos y enzimas activas, que tienden principalmente a controlar la trombina que se forman cuando se activa el mecanismo de coagulación. La concentración de trombina es regulada además, por 4 inhibidores específicos de trombina dentro de los cuales la Antitrombina es considerada el más importante ya que es capaz de inhibir también otras proteasas, como son los factores IXa, Xa, XIa y XIIa, plasmina, y calicreína. Los otros inhibidores de trombina son la α_2 -macroglobulina, el cofactor II de heparina y la α_1 -antitripsina. Muchos años pasaron desde que en 1964 MacFarlane ⁽²⁾ describió la cascada de la coagulación con las dos vías de activación que aún hoy siguen siendo didácticas y totalmente vigentes en la comprensión del mecanismo de coagulación. Las investigaciones posteriores dieron a conocer múltiples interrelaciones entre ambas vías que llevaron a integrar a todos los factores de coagulación en una única vía de activación que otorga un papel protagónico al Factor Tisular que al ser expuesto por una lesión en el tejido, se compleja con el FVII constituyéndose en el principal disparador de la coagulación in vivo. ⁽³³⁾ La vía intrínseca iniciada por el ensamblaje de las proteínas de la fase de contacto en las superficies cargadas negativamente, sería un mecanismo alternativo, con un papel secundario en la activación de la coagulación. Los conocimientos actuales son el resultado de décadas de observaciones clínicas y de experiencias de laboratorio con nuevas tecnologías en purificación de proteínas, cultivo de tejidos y biología molecular que han ayudado a esclarecer los mecanismos de activación de la cascada. Algunos hallazgos esclarecedores han sido los siguientes:

- El complejo FVII/FT participa en la activación tanto del FX que como del FIX, por lo que las dos vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca, van unidas casi desde el inicio del proceso. Esto llevó a plantear en la década del 80 que el principal evento iniciador, in vivo, de la coagulación es la exposición del FT. ^(34,35)

- el descubrimiento del TFPI, inhibidor del complejo FVIIa/FT, también por los años 80, colaboró con la idea de que la activación de la coagulación in vivo pasa por lo que llamamos vía extrínseca.

- la ausencia de complicaciones hemorrágicas en pacientes con deficiencias de los factores de la fase de contacto, con excepción del FXI ^(36,37,38) destituye a la vía intrínseca del papel preponderante que se le adjudicaba

- el hallazgo en la década de los 90 ⁽³⁹⁾ que tanto la trombina como el FXa pueden activar al FXI en presencia de plaquetas activadas y quinínógenos de alto peso molecular ⁽⁴⁰⁾. Este sería un mecanismo independiente de FXII y precalicreínas, que permite explicar la ausencia de hemorragia en la deficiencia de estos dos factores.

En esta forma de describir la activación del mecanismo de coagulación, la plaqueta parecería tener un papel secundario, sin embargo, con el correr de los años múltiples investigaciones, muchas de ellas casi simultáneas ^(41,42) coincidieron en describir el mecanismo de activación de la coagulación, colocando a la plaqueta en un papel protagónico ⁽⁴³⁾. Es indiscutible que las plaquetas son fundamentales en la hemostasia primaria, ya que son las primeras en responder luego de la vasoconstricción que sigue a la lesión endotelial. Se adhieren a la zona injuriada, se activan, liberan una serie de agonistas que promueven la agregación plaquetaria, liberan sustancias quimiotácticas que atraen a los factores de la coagulación y suministran una superficie eficiente para la generación de trombina, o sea que localizan la coagulación en el sitio exacto donde es necesaria la formación del tapón hemostático. Las plaquetas activadas externalizan la fosfatidil serina y el fosfatidil inositol en su membrana, a través de un mecanismo de flip flop, y sobre ellas se depositan los complejos tenasa y protrombinasa de la coagulación. Este es un proceso local, no progresivo, que está eficientemente limitado por las cantidades de FT expuestas en un área relativamente pequeña, por la dilución de los activadores en el flujo sanguíneo, por la acción del TFPI que inhibe localmente al complejo FVIIa/FT y por otros inhibidores fisiológicos de la coagulación.

Este concepto que tiene en cuenta la participación de la plaqueta y de las membranas celulares en general en este proceso, se basa en el llamado **“modelo celular de activación de la**

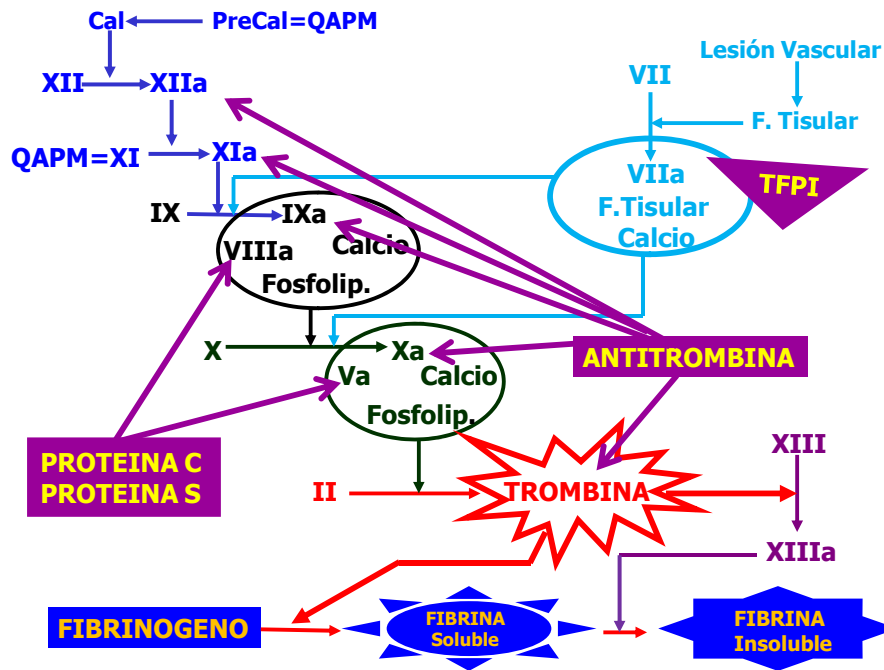


Figura 14: Sitios de acción de los inhibidores fisiológicos, Antitrombina, Proteína C, Proteína S y TFPI.

Como hemos visto, el mecanismo de coagulación es el resultado de la interacción de distintos zimógenos y serino proteasas vitamina K dependientes, asociadas con cofactores que, usando de nexo al Calcio, se ensamblan sobre los fosfolípidos de membrana que están cargados negativamente y permiten el anclaje de los complejos como la tenasa y la protrombinasa. En condiciones normales estos fosfolípidos están presentes en la cara interna de la membrana y durante la activación plaquetaria sufren una translocación hacia la cara externa. Así la membrana plaquetaria se transforma en una superficie catalítica para que ocurran las reacciones entre los factores de coagulación y orientan la formación de la malla de fibrina directamente hacia el sitio de la injuria tisular. En el estado de reposo dos enzimas, una translocasa específica de aminofosfolípidos (fosfatidilserina y fosfatidilinositol) y una flopasa, mantienen el estado dinámico de asimetría fosfolípídica de la superficie plaquetaria. Así los fosfolípidos cargados negativamente se encuentran hacia el lado interno de la membrana plaquetaria, gracias a que la translocasa transporta aminofosfolípidos contra gradiente, desde la cara externa hacia la interna de la membrana en un proceso ATP dependiente. Otra enzima, la escramblasa que se activa por el ingreso de Calcio durante la activación plaquetaria, rompe esta asimetría redistribuyendo la fosfatidilserina de su posición interna a una nueva posición en el exterior de la membrana. (Figura 15) Así las plaquetas expresan en su cara externa fosfolípidos negativos sobre los que se activan los factores de coagulación que interaccionan con ellos, a través de sus dominios gamma carboxiglutámicos. El incremento de la concentración de Calcio intraplaquetario activa otra proteasa llamada calpaína que se encarga de la formación de microvesículas plaquetarias con capacidad procoagulante y con expresión de P-selectina, que permite la interacción con los leucocitos, fundamentalmente en los procesos inflamatorios.

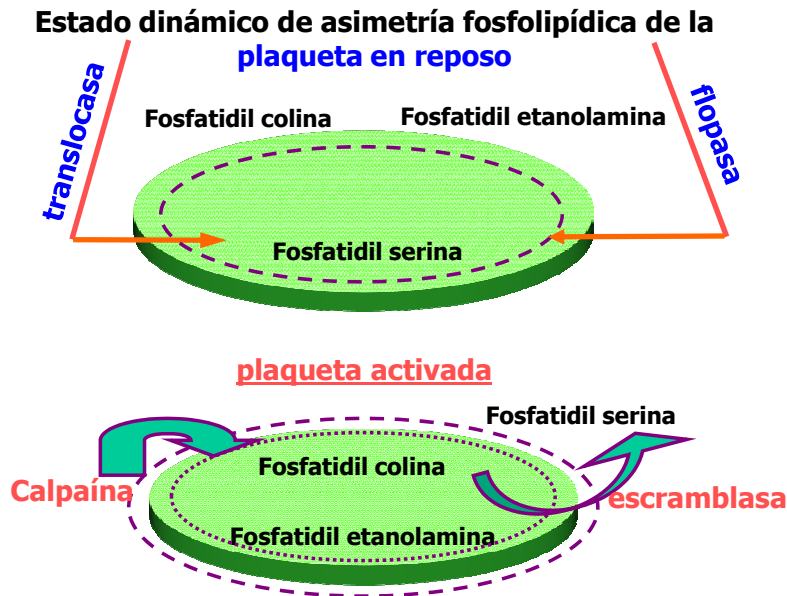


Figura 15

Las plaquetas contribuyen al proceso de coagulación aportando Factor V plaquetario que se encuentra almacenado en los gránulos α , aproximadamente un 20% del total del FV plasmático es liberado durante secreción plaquetaria. Pequeñas cantidades de FXI y la subunidad α del FXIII también están almacenados en la plaqueta.

Todos los factores de coagulación se sintetizan en los hepatocitos, menos el FVIII que se sintetiza en los sinusoides hepáticos. Para la formación de los complejos enzimáticos sobre la superficie fosfolipídica son esenciales los factores vitamina K dependientes que pueden interaccionar con los fosfolípidos de la membrana a través de su dominio amino terminal que contiene residuos de ácido γ carboxiglutámico. El Calcio actúa de nexo entre los fosfolípidos y el dominio GLA de estos factores. El FII, el FVII, el FIX, el FX y los inhibidores Proteína C y Proteína S, también las proteínas Z, M, la aterocalcina y la osteocalcina son vitamina K dependientes.

En el hígado se sintetiza el precursor que es una pre pro molécula del factor de coagulación, que posee un péptido señal encargado de enviar a la molécula al Retículo Endoplásmico y un Propéptido necesario para la γ carboxilación que es reconocido por la carboxilasa. Estos péptidos son escindidos antes de que la molécula madura sea liberada a la circulación. Los factores para ser biológicamente activos requieren el aporte de un grupo carboxilo extra en la posición γ de los residuos de ácido glutámico ubicados en el extremo amino terminal de la proteína. (Figura 16) Este aporte del γ carboxilo extra le permite al factor unirse a las superficies fosfolipídicas, acelerando la cinética de la coagulación ya que concentran sustratos y enzimas sobre una misma matriz sólida y las reacciones ocurren con mucha más eficiencia que en fase fluida. Esta γ carboxilación ocurre a nivel post ribosomal por acción de una carboxilasa dependiente de la Vitamina K. La introducción del carboxilo extra se logra a expensas de la oxidación de la vitamina K reducida (hidroquinona), a su derivado epóxido que por acción de una reductasa regenera nuevamente vitamina K reducida, que es la forma activa para su empleo ulterior ⁽⁵⁰⁾ (Figura 17) Esta reacción puede ser interferida por la acción de drogas anti-vitamina K como son los anticoagulantes orales que inhiben las vitamina K reductasas y disminuyen la cantidad de Vitamina K reducida disponible, de esta manera se inhibe la reacción de γ carboxilación ⁽⁵¹⁾. Entonces se liberan a circulación factores normales en su composición aminoacídica pero que carecen de grupos γ carboxi glutámicos por lo que la unión del Factor al Calcio es defectuosa y se pierde la habilidad de interaccionar con los fosfolípidos. Por ello los factores resultantes tienen menor capacidad para activar el mecanismo de coagulación y se los

denomina genéricamente PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence). Este es el mecanismo de acción de los anticoagulantes orales.

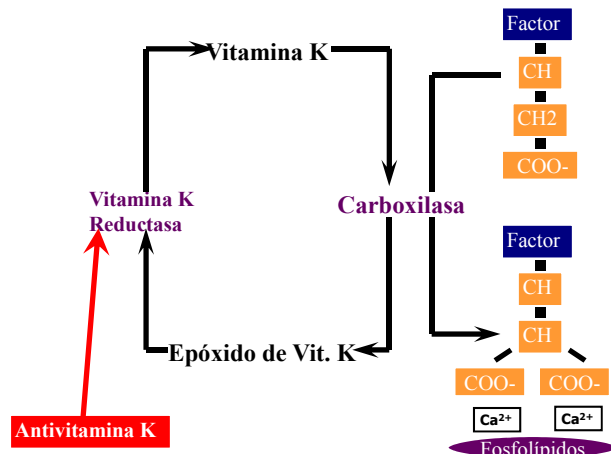


Figura 16: γ carboxilación de los factores vitamina K dependientes

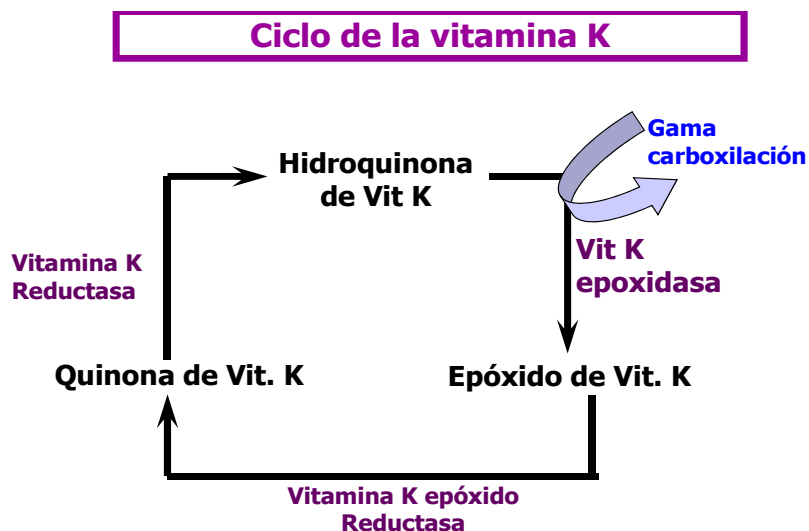


Figura 17: Ciclo de la vitamina K

En presencia de estos anticoagulantes la actividad de los factores vitamina K dependientes desciende de acuerdo con su vida media, (Tabla) la más corta corresponde al FVII (entre 6 y 10 horas) y la más prolongada es la del FII (aproximadamente 72 horas). Cuando se suspende la medicación anti-vitamina K, estos factores vuelven a carboxilarse recuperando su actividad biológica.

Los factores de coagulación se encuentran en exceso en la circulación con respecto a la cantidad necesaria para ejercer la hemostasia, el más predominante es el fibrinógeno con una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$, que es 50.000 veces más alta que la de FVIII, 0.2 nmol/L y que es más que suficiente para acompañar al FIXa en la activación del FX. Los factores vitamina K dependientes se encuentran en concentraciones variables, FVII 10 nmol/L , FIX y FX, 100

nmol/L, mientras que la protrombina alcanza los 2000 nmol/L. De esta manera los factores que actúan en los primeros pasos de la activación de la coagulación están en menor concentración que los que se activan en los últimos pasos. El ensamble de los complejos sustrato-enzima-cofactor sobre las superficies de los fosfolípidos aumenta la concentración local de los componentes de la coagulación y permite su interacción con los mecanismos anticoagulantes que regulan el sistema.

Tabla: concentración plasmática, Peso Molecular y vida media de los factores de coagulación

Proteína	Concentración	PM (kD)	Vida media (hs)
Fibrinógeno	10.000 nM	340	72-120
Protrombina	1500-2000 nM	72	60-72
Factor V	20 nM	330	12-36
Factor VII	10 nM	50	6-10
Factor VIII	0.2 nM	260	10-15
Factor IX	100-170 nM	55	16-30
Factor X	100-170 nM	59	20-60
Factor XI	30 nM	160	50-72
Factor XII	1-6 ng/ml	80	60-80
Factor XIII	30 ng/ml	320	72-200
QAPM	-----	110	-----
Precalicroína	-----	85	150

Una vez desencadenada la coagulación, el nudo del mecanismo es la activación del FX. El FXa resultante se puede inhibir farmacológicamente con bajas dosis de heparina, en cambio la trombina sólo se inhibe con altas dosis de heparina. Por eso que preventivamente la inhibición se realiza con poca heparina y durante el tratamiento del episodio trombótico, se necesitan mayores cantidades de este anticoagulante. Éste es el concepto de profilaxis (inhibición del FXa) y de tratamiento (inhibición de trombina) empleando heparina. Los fármacos que inhiben directamente al FXa como el Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, o a la trombina, como el Dabigatrán, se comienzan a usar con bastante aceptación, aunque aún falta experiencia en el manejo de dosis, contraindicaciones, antídotos y algunos aún están en Fase III de investigación^(52,53,54) Sin embargo, los fármacos que antagonizan la acción de la vitamina K (warfarina, acenocumarol) por el momento siguen siendo la terapia más utilizada en la prevención crónica de procesos trombóticos, realizando los controles habituales para mantener de forma permanente el nivel de inhibición de la coagulación que evite fenómenos trombóticos o hemorrágicos.

Bibliografía

1. Mann KG. Thrombin generation in hemorrhage control and vascular occlusion. *Circulation*. 2011; 124: 225-235.
2. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964;202:498-9.
3. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310-13
4. Davie EW. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 50819-50832.
5. Tankersley DL, Finlayson JS. Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry*. 1984;23:273-9.

6. Dunn JJ, Silverbeg M, Kaplan AP. The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kalikrein. *J Biol Chem.* 1982;257:1779-84.
7. Thompson RE, Mandle R, Kaplan AP. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest.* 1977; 60:1376-80.
8. Bouma BN, Griffin JH. Human blood coagulation factor XI. Purification, properties and mechanism of action by activated factor XI. *J Biol Chem.* 1977;253:6432-35.
9. Motta G, Rojkjaer R, Hasan AAK, Cines DB, Schmaier AH. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation of endothelial cells: mechanism for contact activation. *Blood* 1998;91:516-28
10. Colman R, Clowes A, George S, Goldhaber Z. Marder VJ. Overview of Hemostasis. En: *Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice.* Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S. 2006; 5^o Ed. Lippincott Williams. & Wilkins; 2006:1-35
11. Fujikawa K, Titani K, Davie EW. Activation of bovine factor X (Stuart factor): Conversion of factor X α to factor X β , *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975;72: 3359-3363
12. Schmaier AH, Rojkjaer R, Chiriat Madar. Activation of the plasma kalikrein/kinin system in cells. A revised hypothesis. *Thromb Haemost* 1999;82:226-33
13. Eigenbrot C. Structure, function, and activation of coagulation factor VII. *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3:287-99.
14. Zhong D, Bajaj M, Schmidt A and Bajaj S. The N-terminal Epidermal Growth Factor-like Domain in Factor IX and Factor X Represents an Important Recognition Motif for Binding to Tissue Factor, 2002 *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 3622-3631.
15. Kanse SM, PAradhuleva M, MUhl L, Kemkes-Matthes B, Sedding D, Preissner K Factor VII activating protease (FSAP): vascular functions and role in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2008;99:286-9.
16. Römisch J. Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biol Chem* 2002;383:1119-24.
17. Nigel Mackman Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004, 24:1015-1022
18. 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* 1989;86:2839-43
19. Wilcox JN, Noguchi S, Casanova J. Extrahepatic synthesis of factor VII in human atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:136-41
20. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *The Journal of Pathology.* 2006, 3:327–33
21. Rapaport SI, Rao LVM,. The tissue factor pathway: how it has become a prima ballerina. *Thromb Haemost* 1995;74:7-17.
22. Owens AP, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost.* 2010 ;104(3):432-9.
23. Schafer AI. Coagulation cascade: an overview. En: Loscalzo J, Schafer AI, eds. *Thrombosis and hemorrhage.* Boston: Blackwell Scientific; 1994. p. 3-12.
24. Monroe DM, Roberts HR. Hoffman M. Platelet coagulation complex assembly in a tissue-factor initiated system. *Br J Haemat.* 1994;88:364-71.
25. Chen Z, Pelc LA, Di Cera E. Crystal structure of prethrombin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 19278–19283.
26. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet* 2000;355:1627-32
27. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1894-904.
28. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona E. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiol Rev.* 2011;91:931-72.
29. Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011;9:9-20.
30. Inbal A, Dardik R. Role of coagulation factor XIII in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:162-5

31. Di Cera E. Thrombin. Mol Aspects Med. 2008;29:203-54.
32. Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. J. Thromb Haemost. 2007;5:196-202
33. Zur M, Nemerson Y. Kinetics of factor IX activation via the extrinsic pathway dependence of km on tissue factor. J Biol Chem 1980; 255:5703-7
34. Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". Thromb Haemost. 1995;74:7-17.
35. Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. Blood. 1982;60:1353-8
36. Ragni, MV, Sinha D, Seaman F, Lewis JH, Spero JA, Walsh PN. Comparison of bleeding tendency FIX coagulant activity and FXI antigen in 25 FXI deficient kindres. Blood. 1998;65:719-24
37. Bolton-Maggs PH, Young Wan Yin B, MacCraw AH, Slack J, Kernoff PB. Inheritance and bleeding in FXI deficiency. Br J Haematol. 1988;69:521-8
38. Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. FXI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. N Eng J Med. 1991;335:153-8
39. Naaito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin in the presence of negatively charged surfaces. J Biol Chem. 1991;266:7353-8
40. Oliver JA, Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biol 2002;22:1381-1389,.
41. Schafer AJ. Hypercoagulable states: molecular genetics to clinical practice. Lancet. 1994;344:1739-42.
42. Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet coagulation complex assembly in a tissue-factor initiated system. Br J Haematol. 1994;88:364-71
43. Hoffman M, Monroe DM: A Cell-Based Model of Hemostasis. Thromb Haemostas, 85:958-65, 2001.
44. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:17-25
45. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. J Thromb Haemost. 2007;5:1097-105.
46. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all thrombin for ?. J Thromb Haemostas 2003;1:1504-1514.
47. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make a perfect clot?. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:41-48.
48. Altman R, Scazzioa A, Rouvier J, Gonzalez C. Effect of sodium arachidonate on thrombin generation through platelet activation, inhibitory effect of aspirin. Thromb Haemost 2000;84:1109-12
49. Altman R, Scazzioa AS, Herrera ML, Gonzalez C Thrombin generation by activated factor VII on platelet activated by different agonists. Extending the cell-based model of hemostasis. Thromb J. 2006; 21;4:5
50. Furie B, Bouchard B. Vitamin K dependent biosynthesis of γ carboxyglutamic acid. Blood 1999;93:1798-180
51. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF like domains to the function of vitamin K dependent factors. Crit Rev Eukaryotic Gene Expression. 1999;9:59-88
52. Ufer M. Comparative efficacy and safety of the novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in preclinical and clinical development. Thromb Haemost. 2010;103:572- -85
53. Eerenberg ES, van Es J, Sijpkens MK, Büller HR, Kamphuisen PW. New anticoagulants: Moving on from scientific results to clinical implementation. Ann Med. 2011 Aug 24.
54. Samama MM, Mendell J, Guinet C, Le Flem L, Kunitada S. In vitro study of the anticoagulant effects of edoxaban and its effect on thrombin generation in comparison to fondaparinux. Thromb Res. 2011 Aug 16