

Desafíos a los paradigmas en hemostasia

Challenges to hemostasis paradigms

Korin J.

Consultor de Hematología del Sanatorio de los Arcos

jkorin2009@hotmail.com



CONFERENCIA
NACIONAL
"DR. JORGE ROUVIER"

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 • Número Extraordinario
XII Congreso del Grupo CAHT: 110-115
Septiembre 2016

Palabras clave: Hemostasia,
Coagulación,
Paradigmas.

Keywords: Hemostasis,
Coagulation,
Paradigms.

Introducción

Para lograr una adecuada hemostasia participan varios sistemas que involucran más de 100 proteínas y varias células circulantes y de la pared vascular. El objetivo es preservar la integridad de un sistema circulatorio cerrado a alta presión, con actores inactivos pero capaces de reaccionar en segundos a una injuria vascular y formar un trombo localizado y proporcional a la noxa.

En oposición al sistema cerrado de un tubo o cubeta, los trombos hemostáticos o patológicos son un sistema abierto con especies reactivas en rápida dilución según sea el flujo local.

Esta presentación tratará de integrar los conceptos bioquímicos tradicionales con los aportes de nuevos métodos como manipulación genética en roedores, modelos experimentales intravitales de trombosis y

modelos computacionales bajo diferentes velocidades de flujo.

Bibliografía

1. Panteleev MA, Dashkevich NM, Ataulakhanov FI. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015; 136: 699.
2. Guria K, Guria TH. Spatial aspects of blood coagulation: two decades of research on the self-sustained traveling wave of thrombin. *Thromb Res* 2015; 135: 423.
3. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what we have learned? *Blood Rev* 2012; 26: 197.

Paradigma 1

La hemostasia primaria dependiente de FvW y plaquetas y la secundaria que lleva a la formación de fibrina, son sucesivas.

Éste es un concepto didácticamente válido para diseccionar las contribuciones relativas de plaquetas y del sistema de coagulación. Los modelos de trombosis con imágenes vasculares intravitalas de ventana transparente en el músculo cremáster o en el mesenterio murino, muestran que el depósito de plaquetas y de fibrina es virtualmente simultáneo. Se forma fibrina a los 12 segundos de la injuria a estos micro-vasos. 10 nM de trombina coagulan el fibrinógeno en 10 segundos por lo que la generación de trombina debe ser instantánea con la injuria y no dependiente exclusivamente de activación plaquetaria. Inversamente, cualquier defecto congénito, o por terapéutica dirigida a las plaquetas, inhibe en parte la generación de trombina. La iniciación del trombo en este sistema es a través de láser o cloruro férrico y puede discutirse su relevancia para asimilarlo a un trombo hemostático o patológico en otras áreas del organismo como grandes venas o arterias. Sin embargo, es innegable que el concepto de plaquetas en la hemostasia primaria y cascada de coagulación en el refuerzo secundario de un trombo inicialmente plaquetario es una sobre-simplificación.

Bibliografía

1. Bellido-Martin L, Chen V, Jasuja R, Furie B, Furie BC. Imaging fibrin formation and platelet and endothelial cell activation in vivo. *Thromb Haemost* 2011; 105: 776.
2. Furie B. Pathogenesis of thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:255.
3. Mann KG. Thrombin Generation in Hemorrhage Control and Vascular Occlusion. *Circulation* 2011; 124: 225.

Paradigma 2

El factor tisular de células que lo sintetizan en forma constitutiva es el activador de FVIIa.

El elemento clave para la generación de trombina está dado por la interacción de factor tisular (FT) de membrana con 1-2% de FVIIa preexistente en el plasma. La concentración de FT está relacionada a la injuria. La distancia entre la luz vascular y el FT accesible es mucho menor en la microvasculatura

que en una arteria sana. Una placa arterial subendotelial acerca esta distancia y su ruptura por factores bioquímicos de su composición, hemorragia en neo-vasos o por fuerzas hemodinámicas, expone FT al plasma circulante. Tejidos con baja concentración de FT como músculos y articulaciones implican una mayor dependencia de ellos a la propagación de coagulación mediada por Xasa intrínseca. Dada la dificultad en la hemofilia severa de esta propagación, se explica la propensión para hemartrosis y sangrado muscular. Existen otras fuentes de FT inducibles por inflamación en monocitos y células endoteliales. Tiene alta relevancia fisiopatológica para la iniciación y propagación del trombo la presencia de FT en micropartículas de plaquetas y de monocitos a través de selectina P con su ligando PSGL-1 (CD162). Esto explicaría el hallazgo de pequeñas concentraciones circulantes de FT (100–150 pg/ml). El FT de monocitos podría mantener un nivel basal de activación de coagulación que explique valores fisiológicos de Fibrinopéptido A, péptidos de activación de FIX y FX, F1+2 y complejos TAT.

Bibliografía

1. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011; 108: 1284.
2. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg*. 2009 ; 108: 1447.
3. Orfeo T, Brummel-Ziedins KE, Gissel M, Butenas S, Mann KG. The nature of the stable blood clot procoagulant activities. *J Biol Chem* 2008; 283: 9776.
4. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, et al. Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. *J. Exp. Med*. 2003; 197: 1585.

Paradigma 3

La principal función plaquetaria en la hemostasia secundaria es el aporte de fosfolípidos aniónicos -fosfatidilserina (PS) - de membrana.

Las plaquetas ocupan un rol importante en hemostasia, inflamación y respuesta inmune. En el sistema coagulación, el concepto clásico es que su papel prin-

cial es la provisión de membranas ricas en PS para el ensamble de los complejos X y IIasa. Se han identificado dentro de un trombo subpoblaciones plaquetarias con alta exposición de PS al estimularse con colágeno y trombina denominadas super-plaquetas. La concentración normal de plaquetas es suficiente para que las membranas con PS no sean un limitante para la coagulación. Sin embargo, aun en condiciones de extrema trombocitopenia, puede producirse trombosis, especialmente con sepsis asociada.

Otras fuentes de PS se han identificado: endotelio y hematíes. En modelo de trombosis intravital se observa que más allá del núcleo plaquetario del trombo, el complejo protrombinasa se ensambla sobre PS de endotelio. En los hematíes, altos estrés de cizalladura (shear stress), daño por complemento o estrés oxidativo pueden activar la scramblasa. Esos factores favorecen además la liberación de micropartículas eritrocíticas con PS y aumentan la adhesividad del glóbulo rojo al endotelio. La población normal tiene 0.5% de hematíes con PS en superficie y hay unos 550 sitios de unión para protrombinasa por hematíe PS+. Estudios de potencial endógeno de generación de trombina muestran que éste es afectado por niveles crecientes de GR agregados a plasma pobre en plaquetas, en magnitud incluso superior al que aportan las plaquetas. El trombo rojo -rico en hematíes- tiene marcada reducción de permeabilidad y lisis más dificultosa. En él los hematíes cambian a una forma poliédrica (poliedrocitos). El FXIII y una malla de fibrina densa como la formada en presencia de altas concentraciones de protrombina, aumentan el contenido de hematíes. Finalmente, en los últimos años se ha jerarquizado el papel de los polifosfatos (PP) que aportan los gránulos densos plaquetarios durante la secreción. Los PP aceleran la activación de FV por FXa o FIIa y de FXI por trombina y disminuyen la eficiencia de inhibición de TFPI sobre FXa. Se discute si el PM de los PP plaquetarios es suficiente para aumentar la polimerización de fibrina y activar directamente el FXII.

Bibliografía

1. Kodigepalli KM, Bowers K, Sharp A, Nanjundan M. Roles and regulation of phospholipid scramblases. *FEBS Lett* 2015; 589: 3.
2. Ivanciu L, Krishnaswamy S, Camire RM. New insights into the spatiotemporal localization of prothrombinase in vivo. *Blood* 2014; 124: 1705.
3. Du VX, Huskens D, Maas C, et al. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin Thromb Haemost* 2014; 40: 72.
4. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* 2014; 123: 1596.
5. Smith SA, Morrisey JH. Polyphosphate: A new player in the field of hemostasis. *Curr Opin Hematol* 2014; 21: 388.

Paradigma 4

La hemostasia secundaria finaliza con la formación de fibrina.

El concepto bioquímico clásico es que el punto final de la coagulación es la presencia de un coágulo de fibrina en un tubo o cubeta detectable por medios ópticos visuales o automatizados. En el organismo, la aparición de una malla de fibrina es sólo un paso más del mecanismo hemostático tendiente a la reparación de la injuria. Éste continúa con la retracción de esa malla, su remodelación por enzimas del sistema fibrinolítico plasmático y pericelular -originado en la invasión monocítica del trombo inicial- y el empleo de esa red como guía para la proliferación vascular y fibroblástica. Resulta interesante biológicamente que la condición nula (null) para fibrinógeno no es letal intra-útero en ratones, en forma similar al humano. ¿Formar fibrina entonces no sería la función esencial de la trombina?

Relacionado con este concepto está la llamada paradoja de la trombina. Al momento de producirse la coagulación del fibrinógeno recién está finalizando la fase de iniciación e iniciándose la propagación en la cascada, de tal manera que se ha generado poco más de 1-2 nM de trombina y ya se han activado plaquetas, FV, FVIII, FXIII y se han iniciado los clivajes de fibrinopéptidos A y B. Los siguientes escasos nM de trombina se emplean en la propagación para mayor activación de cofactores, plaquetas y FXI. El 95 % restante de la trombina queda en el trombo presumiblemente para continuar en funciones inflamatorias o proliferativas reparadoras de la lesión o, si difunde, es inhibida por AT o se une a trombo-modulina del endotelio sano vecino. Por lo tanto, todos estos fenómenos luego de la coagulación del fibrinógeno son invisibles a las pruebas habituales

de laboratorio. Las funciones de reparación tisular ocurren fundamentalmente por la activación de receptores celulares activables por proteasas (PARs), entre los cuales el PAR1 está implicado como el más importante. Se debe recordar que las plaquetas murinas no tienen PAR1. La activación de PARs lleva a homo y hetero-dimerización de los mismos y a transactivación de varios otros receptores celulares relacionados con proliferación (EGFR, PDGFR, insulin-like GF), VEGF, S1P, TLRs, receptores de prostanoides, de TGF- β , etc.

La cantidad de trombina generada está en función de la magnitud del estímulo original y sobre todo de la concentración de zimógenos e inhibidores. Este balance define una situación llamada normal (entre 50 y 150% en la concentración plasmática) y cuyo desbalance hacia el menos corresponde a patologías hemorrágicas y hacia el exceso a los estados trombofílicos. La fibrina producida es altamente sensible en su calidad a la magnitud de trombina generada. En caso de escasa producción de trombina, la malla de fibrina es más laxa, elástica, menos rígida y más susceptible a la lisis, con características opuestas si hubiera exceso de trombina. La estructura del trombo depende además de la concentración de fibrinógeno, de la actividad de FXIII y XII, de glicosilación y acetilación en la malla, de la concentración de homocisteína y, como vimos antes, de la cantidad de hemáties y la acción de polifosfatos plaquetarios.

Bibliografía

1. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 17.
2. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for?. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1504.
3. Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors-focus on receptor-receptor interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell communication and signaling* 2013; 11: 86.
4. Domingues MM, Macrae FL, Duval C, et al. Thrombin and fibrinogen γ' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood* 2016; 127: 487.
5. Byrnes JR, Duval C, Wang Y, et al. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α -chain crosslinking. *Blood* 2015; 126: 1940.

Paradigma 5

El FXa puede generarse por activación de FVII o de FXII.

El concepto clásico de la cascada involucra la activación de FXII como iniciadora de la vía intrínseca. El ratón nulo (null) para FXII tiene aPTT prolongado, inclusive más allá del que se produce por concentraciones terapéuticas de heparina, pero no tiene fenotipo hemorrágico ni aumenta el tiempo de sangrado por incisión de la cola. Otras proteínas de la fase de contacto como precalicreína y kininógenos de alto PM, prolongan con su déficit el aPTT, pero tampoco se relacionan con sangrado. En cambio, las bajas concentraciones de FXI pueden producir hemorragia especialmente con cirugías en áreas de alta actividad fibrinolítica (génito-urinaria o en fauces). Los activadores de FXII como sílica o caolín no tienen relevancia fisiológica. Activación de FXII sí puede ser causal de trombos patológicos como es el caso de DNA en netosis, polifosfatos plaquetarios, membranas artificiales en circuitos de circulación extracorpórea y colágeno de membranas basales. En esta línea hay extensa investigación tratando de inhibir la activación de FXII, lo que permitiría inhibir el trombo patológico sin producir sangrado. Se han empleado anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos anti-sentido, inhibidores alostéricos, sintéticos o naturales, y aptámeros. Mutaciones de FXII se relacionan con angioedema hereditario tipo III y la activación de quininas por FXII da cuenta de patologías como fuga (leakage) capilar por heparina de mastocitos y por heparina contaminada.

Según los conceptos actuales, el FXI es activado por trombina en superficie plaquetaria y esta retroalimentación es importante para la propagación espacial del trombo. Estudios de población en Israel, el país con mayor incidencia de déficit de FXI, revelan un efecto protector de este déficit sobre accidente cerebrovascular y trombosis venosa. En ese sentido, una comunicación reciente demuestra la efectividad del empleo de oligonucleótidos antisentido para FXI en la prevención de trombosis venosa en reemplazo electivo de rodilla, con menor riesgo hemorrágico que la enoxaparina.

Bibliografía

1. Gailani D, Bane CE, Gruber A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1383.
2. Renne T, Schmaier AH, Nickel KF, Blombäck M, Maas C. In vivo roles of FXII. *Blood* 2012; 120: 4296.
3. Dashkevich NM, Ovanesov MV, Balandina AN, et al. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J* 2012; 103: 2233.
4. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2015; 372: 232.

Paradigma 6

El endotelio es el regulador del flujo vascular; cómo censa la célula endotelial (CE) el tipo de flujo y cómo eso regula sus funciones.

Además de las funciones trombo-protectoras mediadas por prostaciclina, ecto ADPasa CD39, EPCR, trombomodulina, heparan-sulfato, TFPI y t-PA, la CE regula el flujo vascular promoviendo vasodilatación por prostaciclina y NO y vasoconstricción por endotelina. La CE es capaz de censar el tipo de flujo al que es expuesta y provocar respuestas adaptativas o patológicas a los cambios de flujo. El censado de la fuerza de roce por mecano-receptores produce una señal adaptativa en blancos intra-celulares que cambian la estructura, el metabolismo y la expresión génica de la CE. EL ESTÍMULO: La fuerza de roce es la que ejerce un líquido por unidad de área vascular y se expresa en dyn/cm^2 . En las arterias es de 5 a 25 dyn/cm^2 . Según los patrones de flujo, la fuerza de roce puede ser : (a) laminar -fuerza proporcional a la velocidad del flujo-, (b) pulsátil, (c) oscilatoria, o (d) turbulenta . El flujo alrededor de bifurcaciones o en las áreas distales a una estenosis se vuelve turbulento u oscilatorio. En áreas estenóticas la fuerza aumenta a 30 - 40 dyn/cm^2 . Esto se acompaña de aumento de expresión de endotelina-1 y de moléculas proinflamatorias como NFkB , ICAM-1, VCAM, MCP y E-selectina. El flujo laminar produce un fenotipo atero-protector. EL APARATO DE CENSADO: mecanosoma sobre la membrana de la CE, que consiste de caveola, PECAM, VEGFR, VE-cadherin y posiblemente otros elementos como integrina $\alpha\beta_3$ y estructuras del cito-esqueleto celular. Se han iden-

tificado secuencias GAGACC de promotores en los genes que codifican proteínas que responden a estrés de cizallamiento (SSREs) aunque hay respuestas independientes de ellas. Hay en la CE unos 600 genes regulables por el flujo. TRANSDUCCIÓN: Los cambios de flujo laminar a turbulento o el cese de flujo, producen una transducción mediada por apertura de canales de calcio y fosforilación de PI3K/Akt que activa NOX2 generándose especies reactivas de oxígeno. Estas producen activación de factores de transcripción NFkB, HIF-1 α y AP-1 que resultan en proliferación endotelial para angiogénesis y vasodilatación por activación de e-NOS tratando de restaurar un flujo normal. La regulación transcripcional por el flujo se realiza por factores con funciones distintas sobre la CE como AP-1, NF-KB, Egr-1, ERK-5, GATA 6 y Kruppel-like factor 2 (KLF2), cada uno de los cuales se une a un motivo en el promotor del gen que codifica proteínas endoteliales. Por ejemplo, el gen de trombomodulina tiene un motivo CACCC que facilita la regulación positiva por flujo laminar por KLF2. En cambio el flujo cíclico activa NFkB, un regulador negativo de la expresión de trombomodulina. La regulación post-transcripcional está mediada por miRs, proteínas ligantes de RNA que modifican la velocidad de degradación de mRNA. El flujo laminar activa las vías de MEF5/ERK5/MEF2 y AMPK que convergen en la regulación positiva (*up-regulation*) transcripcional de KLF2. KLF2, factor de transcripción del flujo laminar, produce regulación positiva de eNOS, trombomodulina, factor nuclear eritroide 2 y de proteínas de uniones estrechas intercelulares ejerciendo efectos anti-inflamatorios, antitrombóticos, anti-oxidativos y de disminución de la permeabilidad en el endotelio. KLF2 reduce la actividad de NFkB e inhibe la expresión de VCAM-1, E-selectina, PAI-1 y FT en CE. Diferentes miRs intervienen en la regulación anti-inflamatoria del flujo laminar (miR-143, miR-145, miR-23b y miR-126) y pro-inflamatoria del flujo turbulento (miR 92, miR21 y miR 663). ERK5 se encuentra arriba de KLF2 en la cadena atero-protectora de mediadores sensibles al flujo en el endotelio. Además de promover activación de KLF2, aumenta p53 nuclear y reduce la capacidad apoptótica de la CE. ERK5 aumenta la activación transcripcional de PPAR γ y PPAR δ . Los PPARs son factores de transcripción con actividad anti-inflamatoria por reducir NFkB y la síntesis de TNF. Estas dos moléculas ate-

ro-protectoras constituyen blancos terapéuticos para aumentar la capacidad trombo-resistente endotelial. No casualmente, tratamientos para patologías vasculares, actúan aumentando ERK5 (ejercicio físico, hidroxi-cloroquina) o KLF2 (estatinas) y factores protrombóticos como anticuerpos antifosfolípidos bloquean KLF2.

Bibliografía

1. Chatterjee S, Fisher AB. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20: 899.
2. Martin FA, McLoughlin A, Rochfort KD, et al. Regulation of thrombomodulin expression and release in human aortic endothelial cells by cyclic strain. *PLoS One*. 2014; 9:e108254.
3. Abe J, Berk BC. Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 2378.
4. Le NT, Takei Y, Izawa-Ishizawa Y, et al. Identification of activators of ERK5 transcriptional activity by high-throughput screening

and the role of endothelial ERK5 in vasoprotective effects induced by statins and antimalarial agents. *J Immunol* 2014; 193: 3803.

5. van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RJ, et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res*. 2006; 72: 231.

Conclusión

Los últimos 50 años han producido una explosión de aportes al concepto de hemostasia pasando de un sistema simple de coagulación y fosfolípidos plaquetarios a una compleja integración. Ésta involucra células circulantes, un endotelio vascular heterogéneo y un sistema de coagulación con retro-alimentaciones e inhibiciones altamente reguladas. Todo ello, además, en el contexto de un flujo sanguíneo variable según el requerimiento orgánico, lo que ha llevado a cambios constantes de paradigmas.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara que no posee conflictos de interés.