

Diez preguntas sobre la fisiología de la hemostasia planteadas hoy y a contestar en los próximos años

Ten questions asked today to be answered in the next years about the physiology of the hemostatic system

Korin J

Consultor de Hematología del Sanatorio de los Arcos

jkorin2009@hotmail.com



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 N° Extraordinario: 77-102
Fisiología de la hemostasia normal
Agosto 2017

Palabras claves: sistema hemostático, trombosis, fisiopatología.

Keywords: hemostatic system, thrombosis, physiopathology.

Dedicado a Julio Sánchez Ávalos, quien me enseñó a tratar de ver un poco más allá de los dogmas aceptados.

Introducción

Para lograr una adecuada hemostasia participan varios sistemas que involucran más de 100 proteínas y diversas células circulantes y de la pared vascular. Sucintamente diríamos que hay:

- 1) un componente vascular que produce vasoconstricción inmediata a la injuria, dependiente de un desequilibrio local inmediato entre óxido nítrico y endotelina-1.
- 2) una cadena de eventos rápidos para cerrar la brecha vascular con una malla estable de fibrina por la interacción entre plaquetas y el sistema enzimático de serino proteasas de coagulación.

Estas reacciones se producen al ponerse en contacto receptores celulares y sensores proteicos circulantes con elementos que están separados físicamente

de la sangre circulante. La mayor parte de las reacciones ocurre en el espacio extravascular tisular y, de acuerdo a la magnitud de la injuria, puede llegar a comprometerse el flujo en el vaso dañado, por lo que los mecanismos de reparación posteriores deberán restablecer en lo posible la circulación local. *Si terminamos aquí sería como analizar Macbeth diciendo que la obra explica cómo un noble guerrero escocés, codicioso y supersticioso, casado con una señora que lo instiga a ser rey venciendo cualquier reparo moral, logra su objetivo sólo para ser víctima de su ambición, por lo que muere 17 años después demostrándose así que el crimen no paga. Shakespeare, como el mejor dramaturgo después de los clásicos griegos, no merece una aproximación tan superficial. Sin embargo, explicar en deta-*

lle cada uno de los 28 personajes de la obra y sus ambigüedades e interacciones suele ser demasiado para una primera aproximación y sólo lograría espantar al lector.

El presente trabajo tratará de integrar los conceptos de los autores anteriores de este Suplemento de la **Revista HEMATOLOGIA** con un sentido funcional y, en lo posible, de aplicación a la práctica asistencial. Creo que una de las causas del alejamiento del médico general y del hematólogo no especializado en Hemostasia y Trombosis de esta completa fisiopatología está en la profusión de componentes que participan como personajes de la formación de un trombo. Trataré de explicar de manera veraz pero no abrumadora esta constelación de interacciones, porque Macbeth es una obra de demasiado valor para desalentarse por algunas cuestiones áridas marginales y la Hemostasia muestra una atractiva variedad de cooperaciones y antagonismos para el lector atento. No pretendo que una primera lectura sea abarcadora de un tema complejo. Sin embargo, y salvando las distancias, así como el lector no debería perderse en vericuetos para apreciar la belleza de frases como *“La vida no es más que una sombra en marcha; un mal actor que se pavonea y se agita una hora en el escenario y después no vuelve a saberse de él: es un cuento contado por un idiota, lleno de ruido y de furia, que no significa nada”*, tampoco debería ser insensible a los distintos aspectos de una molécula polifuncional fascinante como la trombina y sus varios mecanismos de modulación e inhibición.

Para permitir una lectura escalonada de los temas he dividido el capítulo en 10 preguntas a desarrollar:

1. ¿Cuáles son algunos de los paradigmas cambiantes en hemostasia?⁽¹⁻⁷⁾

La comprensión de la función de los distintos personajes intervinientes se ha enriquecido con los datos aportados por roedores *knock-out* para cada uno de ellos, los estudios de imágenes intravitales en animales y los modelos computacionales en escala múltiple que combinan funciones plaquetarias con cinéticas de coagulación bajo diferentes velocidades de flujo. De estas experiencias han surgido nuevos paradigmas en la hemostasia que han cambiado dogmas previamente reconocidos, como por ejemplo:

A) El rol de las plaquetas: los modelos con imágenes de micro injuria vascular con cloruro férrico o láser no son asimilables, necesariamente, a lo

que ocurre in vivo en el ser humano. pero son más aproximados que un tubo de ensayo. En ellos se aprecia que el depósito plaquetario antecede en muy pocos segundos a la aparición de fibrina, por lo que hemostasia primaria y secundaria sólo pueden separarse por motivos didácticos y escasamente por razones biológicas. Por ejemplo, las plaquetas activadas liberan polifosfatos (PP) muy aniónicos y lineales de 60-100 P sintetizados a partir de ATP, que son activadores de FXII, potenciadores de la activación de FV y de TAFI e inhibidores de TFPI y de complemento. Esto implica que las plaquetas y el sistema de coagulación están interrelacionados mucho más que por el aporte plaquetario de superficies fosfolipídicas de cargas negativas.

- B) Se ha cambiado el punto final de un coágulo visible por el ojo humano o un detector computarizado por la detección de reacciones bioquímicas con repercusión biológica importante que suceden luego de producida la coagulación del fibrinógeno, como la progresiva generación de trombina capaz de activar receptores activados por proteasas (PARs) en células vecinas, entre otros blancos.
- C) En condiciones fisiológicas la vía intrínseca de la coagulación se activa por la acción de trombina sobre FXI y no por el factor XII activado o por la precalicreína y kininógenos de alto PM. En realidad la deficiencia de FXII no tiene repercusión hemorrágica. Pero la deficiencia de FXI aumenta el riesgo hemorrágico en cirugías en áreas de importante actividad fibrinolítica como las fauces o el sistema genito-urinario. El FXII se activa *ex vivo* por compuestos de carga negativa como el kaolín, pero esto no tiene relevancia fisiológica y sólo es útil para la prueba del aPTT o kPTT. Sólo recientemente se ha demostrado que *in vivo* el FXII es activable por DNA y RNA extracelulares provenientes de células con netosis, por polifosfatos plaquetarios y por membranas artificiales en circuitos de circulación extracorpórea. Probablemente estos activadores sean más relevantes para el trombo patológico que para el trombo hemostático. Incluso hay estudios en marcha buscando inhibir al FXIIa con el objeto de frenar un trombo patológico sin producir sangrados.

D) El sistema extrínseco de la coagulación se inicia con la aparición de factor tisular (FT) funcional. Dado que en la mayoría de los vasos el FT se halla en la adventicia, la magnitud de la injuria debería ser muy profunda para que interaccione con FVIIa. Esto jerarquiza el aporte de FT por micropartículas de monocitos y de plaquetas circulantes que contienen FT y PSGL-1 (ligando leucocitario para selectinas), y que interactúan con la P selectina de las plaquetas activadas en el trombo nascente. De esta manera se explica por qué hallamos en forma fisiológica pequeñas concentraciones de FT circulante en la sangre (100-150 pg/ml). El FT de monocitos podría justificar un nivel basal de activación de la coagulación que explique la presencia en sangre de fibrinopéptido A, factor 1+2 y complejos TAT (trombina-antitrombina). También da pie a la pregunta de si ese FT es plenamente funcional antes de incorporarse al trombo. El colágeno subendotelial es un potente activador plaquetario cuando hay denudación endotelial. En su ausencia, como es el caso de inflamación, el principal activador plaquetario es la trombina o las histonas provenientes del núcleo de leucocitos de la lesión luego del fenómeno de netosis (NETs).

E) Las plaquetas son habitualmente las principales proveedoras de membranas con fosfolípidos aniónicos, como fosfatidilserina, donde se ensamblan los complejos de coagulación protrombinasa y tenasa. Pero existen modelos animales sin trombos plaquetarios, ya sea por delección de receptores para trombina o de integrinas, donde de todas formas se logra una malla de fibrina. Se han identificado otras células activadas que pueden remplazar a las membranas plaquetarias, aunque con menor eficiencia, como el endotelio, leucocitos o los mismos hematíes atrapados en el trombo. Hallazgos de autopsia corroboran que pacientes con aplasia medular muy severa han padecido tromboembolismo pulmonar mortal. Pacientes con trombocitopenia severa de origen inmune o por leucemia aguda o trasplante también tienen complicaciones trombóticas.

F) Los mecanismos de regulación de enzimas, cofactores, células o proteínas son variados e incluyen: compartimentalización en estructuras

a liberar (como los cuerpos de Weibel Palade), circulación en forma inactiva como zimógenos y activación al formar un complejo con su activador, su clivaje o una transición en su estructura espacial por reducción u oxidación en puentes disulfuros por protein-disulfuro-isomerasas (PDI) presentes en el trombo hemostático.

G) Los pacientes con afibrinogenemia no tienen sangrado grave excepto en situaciones de trauma quirúrgico. En cambio, los pacientes con trombo-astenia y disminución severa de integrinas IIb-β3 padecen hemorragias graves recurrentes. Recientemente se ha demostrado que se produce depósito de fibronectina plasmática en el sitio de injuria vascular previo a la adhesión plaquetaria. Los gránulos plaquetarios de las plaquetas adheridas en los ratones VWF – fibrinógeno doble *KO* tienen 3-5 veces más fibronectina en ausencia de fibrinógeno circulante. Una vez liberada, la fibronectina en la base del trombo nascente permite activación plaquetaria a través de colágeno con GPVI y $\alpha 2\beta 1$ y de FVW con GP Ib-IX-V. A esto le sigue generación de trombina y reclutamiento de nuevas plaquetas para compensar una malla de fibrina mínima o ausente.

2. ¿Cómo se establece el inicio de un trombo hemostático?⁽⁸⁻⁹⁾

Las plaquetas se mantienen en forma discoide y *no adherente* por la actividad endotelial que: 1) produce prostaciclina y óxido nítrico (ON) que generan un aumento de AMP y GMP cíclicos con función inhibidora plaquetaria, 2) tiene capacidad para metabolizar agonistas como ADP y trombina.

En un endotelio disfuncionante o denudado se inicia el trombo hemostático. Luego de la primera ola de fibronectina mencionada anteriormente, las plaquetas reaccionan a los componentes subendoteliales FVW, colágeno y, con menor relevancia, laminina y vitronectina, merced a receptores específicos de membranas. Los dos principales son GP Ib-IX-V para FVW del subendotelio unido parcialmente a colágeno y GPVI para colágeno (Figura 1). La profundidad de la injuria vascular y la velocidad de flujo en el vaso implicado regulan en parte la importancia relativa de ambos receptores de adhesión. Las plaquetas también son capaces de adherirse a endotelio no denudado pero perturbado en sus fun-

ciones trombo-resistentes, por ejemplo por citoquinas inflamatorias.

La adhesión puede ser seguida, en caso de suficiente potencia y concentración de agonistas activadores, de:

- a) activación plaquetaria (incremento de calcio intracelular de variada magnitud producido por diversos mensajeros).
- b) secreción de contenido de gránulos α y gránulos densos (con acción paracrina sobre otras plaquetas y leucocitos y autocrina sobre la misma plaqueta que tiene receptores para elementos de esos gránulos como P2Y1 y P2Y12 para ADP). Los gránulos densos de las plaquetas aportan además polifosfatos que aceleran la activación de FV por FXa o FIIIa y de FXI por trombina y que reducen la inhibición de TFPI sobre Xa.
- c) agregación plaquetaria por señales de adentro a afuera de las plaquetas que alteran la conformación de la integrina IIB-IIIa activándola como para hacer puentes con fibrinógeno y FVW.

d) expresión de fosfatidilserina en superficie para ensamblar complejos activadores de coagulación tenasa y protrombinasa, generando trombina en concentraciones suficientes para establecer una malla de fibrina que contenga el trombo plaquetario iniciador.

e) contracción del trombo plaquetario dependiente de señales de fuera a adentro de la plaqueta por la GP IIB-IIIa y potenciada por moléculas de contacto en la zona más densa del trombo plaquetario (*semaphorin 4D*, *ephrin/eph kinases*, receptores Gas6/TAM, y moléculas de adhesión de zonas de unión como PECAM, JAM-A y ESAM).

f) reclutamiento leucocitario: los pares relevantes son GPIb plaquetaria con $\alpha M\beta 2$ leucocitario y P selectina plaquetaria con PSGL-1 leucocitaria. En el caso de sepsis o fenómenos inmuno-inflamatorios (no probablemente en el trombo hemostático), la GPIb α plaquetaria es el receptor para histonas de NETs de neutrófilos.

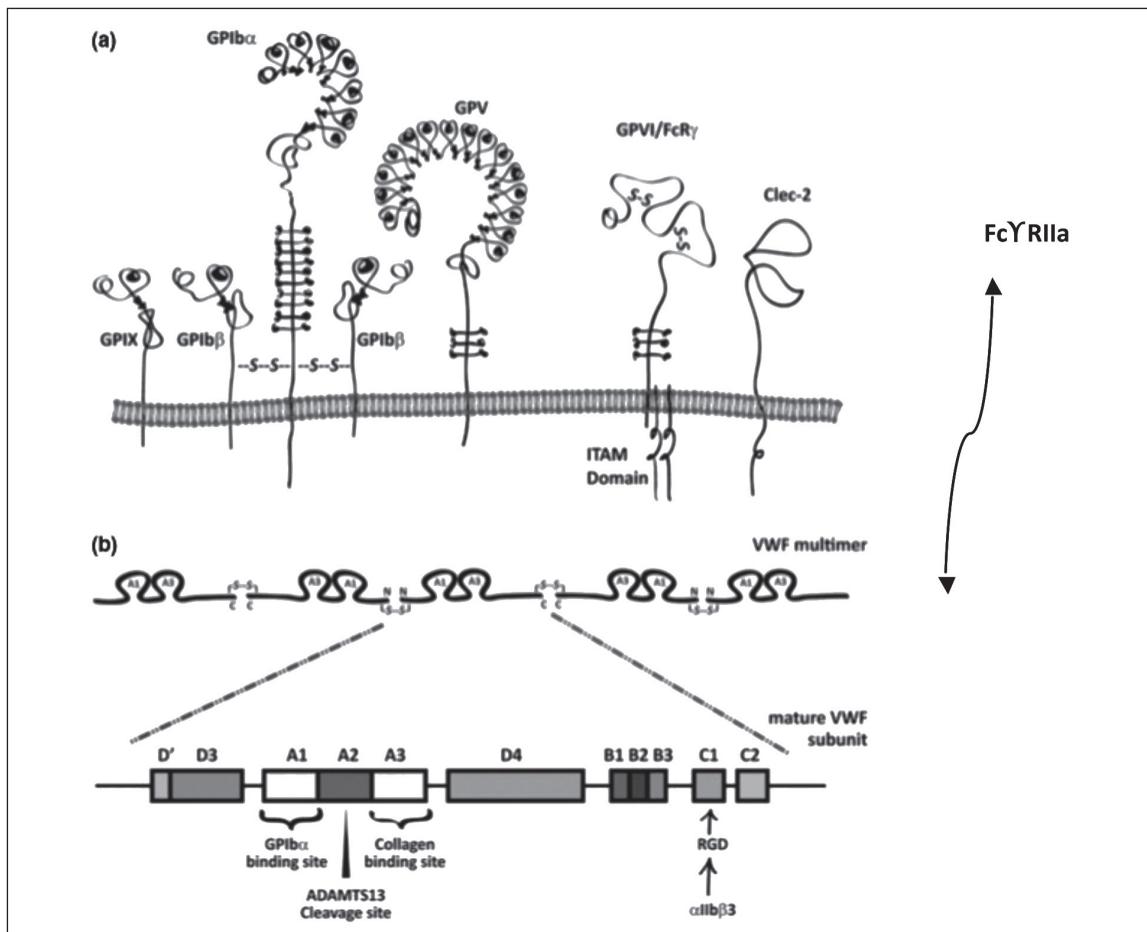


Figura 1. GPIb y FVW en forma de hebra sobre colágeno subendotelial¹. ITAM: motivo de inmuno-receptor basado en tirosina. Tomado de Berndt MC et al. *Haemophilia*. 2014; 20 (Suppl 4): 15.

ceptor PY12, por ejemplo por clopidogrel, evita la propagación del trombo sin afectar el núcleo del mismo.

- c) la trombina, en cambio, se genera en la zona central o núcleo con más contacto interplaquetario, una zona de escasa difusión y penetración de moléculas desde el plasma (inhibidores naturales de trombina como la antitrombina). Si bien la trombina está ligada al trombo, ha perdido sus grupos GLA que la unían a la membrana plaquetaria en el complejo protrombinasa y puede difundir hacia la periferia del trombo. Pero esa zona densa y poco porosa le dificulta la difusión hacia el exterior y aumenta su capacidad para interactuar con los receptores de trombina (PAR 1 y PAR4) plaquetarios, aumentando más aún la activación de ese núcleo compacto de plaquetas.

Las condiciones locales de flujo sanguíneo también son relevantes para la ubicación del trombo plaquetario. La masa plaquetaria en una región estenótica crea zonas de desaceleración adelante de la estenosis. Esta agregación es más dependiente de interacciones VWF/GPIb con integrina α IIb β 3 y se bloquea con inhibidores de generación de TxA2 y de receptores de ADP, por lo que esta combinación farmacológica es especialmente útil en territorio arterial.

La zona central del trombo hemostático muestra plaquetas mucho más activadas, con mayor contenido en calcio y que perdieron su forma discoide y tienen agregados densos, siendo rica en P-selectina. Las plaquetas de la zona periférica pueden retener su forma discoide, han movilizado escaso calcio y no han liberado P-selectina, siendo más sensibles a dislocar los agregados en formación por alteraciones bruscas del flujo sanguíneo. (**Figura 3**).

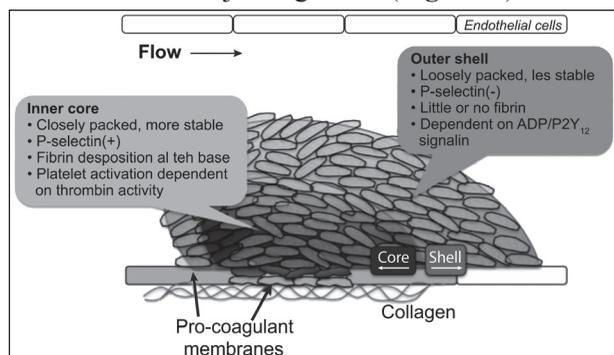


Figura 3. Heterogeneidad del trombo hemostático. Tomado de Stalker TJ et al. *Blood*. 2013; 121: 1875.

3. ¿Qué aspectos recientes pueden ser de interés en plaquetas?⁽¹⁰⁻¹³⁾

- a) Recientemente una proteína plaquetaria “vitamina K dependiente” denominada Gas 6, (previamente mencionada como uno de los pares que participan en la retracción plaquetaria), ha conitado atención por su efecto en la estabilización del trombo ligado a un refuerzo en el mecanismo por el cual la PI3K produce una persistencia del estado de activación de la integrina α IIb β 3. El ratón que no posee la proteína Gas 6 (G6 -/-) está protegido de una trombosis letal y no tiene un fenotipo sangrador. Se postula que el mecanismo involucra acciones de Gas 6 sobre endotelio a través de su receptor TAM. La estimulación produce activación endotelial y aumenta la expresión de P selectina endotelial. Esto aumentaría la adhesión del trombo a la pared vascular. Gas 6 tiene capacidad de unión por sus dominios Gla a fosfatidil serina, especialmente en células apoptóticas, y facilita su remoción por monocitos o macrófagos en el caso de la placa arterial. Todo esto plantea a Gas 6 como un blanco atractivo para terapia antitrombótica. La proteína Gas 6 circula en muy bajas concentraciones en plasma, pero los individuos con niveles más altos tienen mayor riesgo de enfermedad tromboembólica venosa y se ha hallado una asociación entre polimorfismos del gen de Gas 6 y la ocurrencia de ACV.

- b) Los trombos con alto componente plaquetario son característicamente resistentes a la fibrinólisis con t-PA. Las plaquetas tienen en sus gránulos α PAI 1 inhibidor de t-PA y la proteasa nexina 1 (PN-1) que inhibe t-PA unido a fibrina y a plasmina unida a fibrina directamente. Es sabido que la fibrina protege a t-PA y a plasmina de sus inhibidores, por lo que la proteasa nexina 1 tiene especial relevancia fisiopatológica en la resistencia a la lisis de los trombos fibrino-plaquetarios en territorio vascular cerebral y coronario, ya sea retrasando la fibrinólisis endógena como disminuyendo la eficacia de la terapéutica trombolítica. Modelos murinos PN-1 -/- muestran mayor rapidez de respuesta a t-PA y lisis más completa. Claramente, la inhibición farmacológica de PN-1 plaquetaria merece ser explorada como potenciador de los tratamientos trombolíticos.

- c) Otro aspecto que puede ser particularmente importante en las trombosis en territorios arteriales de alto *shear rate* es la formación de extrusiones plaquetarias inducidas por el mismo flujo que es dependiente de la presencia de FVW desplegado sobre una superficie y GPIIb α , promoviendo adhesión plaquetaria no dependiente de GPIIbIIIa.
- d) En los últimos años se han comunicado numerosos aportes que ligan a las plaquetas en funciones extra-hemostáticas como inflamación, inmunidad, reparación tisular y progresión neoplásica. Baste señalar aquí que las plaquetas aportan al plasma o a células en contacto una variedad de moléculas biológicamente activas como factores de transcripción, enzimas del spliceosoma, miRNAs, β defensinas, factores angiogénicos, quemoquinas, citoquinas inflamatorias como CD40L e IL 1 β . De particular interés resulta el aporte de miRNAs a células vecinas a través de canales específicos. Éstas son funciones plaquetarias fascinantes previamente ignoradas.

4. ¿Cómo censa un endotelio normal el flujo sanguíneo?⁽¹⁴⁻¹⁸⁾

En esta parte analizaremos la interacción entre flujo adecuado y endotelio sano vs flujo turbulento y endotelio disfuncional. Un flujo sanguíneo alterado es uno de los elementos de la tríada de Virchow para la trombosis. Un flujo lento provoca hipoxia y disfunción endotelial que reduce la remoción de factores activados generados localmente, si se compara con regiones vasculares donde la concentración de inhibidores naturales circulantes o un endotelio sano es relativamente mayor. El componente vascular de la tríada está dado por un endotelio normofuncionante. Un endotelio normal se adapta a los cambios de velocidad y tipo de flujo. Las células endoteliales responden a diferentes patrones de flujo modificando su capacidad proliferativa, la permeabilidad y la organización de su cito-esqueleto.

El estrés de cizalladura o *shear stress* es el componente tangencial de las fuerzas hemodinámicas que produce el flujo sanguíneo. Actúa en la interfase sangre-endotelio y juega un papel principal en las respuestas vasculares. El mecanismo por el cual el endotelio responde a un estímulo físico y traduce a señales bioquímicas que resultan en una respuesta fisiológica, se denomina mecano transducción. El *shear stress* es la fuerza de roce que la sangre ejerce

por unidad de superficie en la pared vascular y se expresa en dyn/cm². En las arterias los rangos de *shear stress* fisiológicos van de 5 a 25 dyn/cm². Según los patrones de flujo, la fuerza de roce puede ser laminar, pulsátil, oscilatoria o turbulenta.

El flujo laminar mantiene una función endotelial hemostática, las líneas de fuerza son paralelas a la pared del vaso y el *shear stress* es directamente proporcional a la velocidad de flujo. El *shear stress* aumenta con el ejercicio en forma transitoria y en forma crónica en patologías asociadas con aumento del volumen minuto cardíaco. El *shear stress* disminuye crónicamente en insuficiencia cardíaca o en el sector pulmonar de la circulación cuando hay hipertensión pulmonar primaria. Disminuye abruptamente en el paro cardíaco o sectorialmente en la región de una obstrucción vascular o durante el clampeo de una arteria en cirugía.

El patrón de flujo alrededor de las bifurcaciones arteriales o en áreas distales a una estenosis se vuelve turbulento u oscilatorio y puede asociarse a vasculopatías. En áreas de estenosis, el *shear stress* no es proporcional a la velocidad de flujo y se pueden incrementar los valores de *shear stress* a 30-40 dyn/cm². Esto libera diferentes productos desde el endotelio como endotelina-1 (vasoconstrictor), NF κ B (un regulador negativo de la expresión de trombosmodulina), ICAM-1, VCAM, MCP y E-selectina.

El aspecto principal de un endotelio disfuncionante es su incapacidad para percibir los cambios físicos hemodinámicos y bioquímicos de la sangre que lo perfunde y, por lo tanto, es incapaz de responder de manera fisiológica. El endotelio está provisto de mecanosensores para esta función, y estos mecanosomas son los guardianes de las funciones cardiovascular. El mecanosoma puede definirse como una red de mecano-sensores y transductores que convierten una fuerza física en una señal bioquímica y que produce un cambio en la transcripción génica que modifica la estructura celular, sobre todo a nivel del citoesqueleto, y su función. Un complejo multimérico de PECAM-1, VEGFR2 y *vascular endothelial (VE)-cadherin* es el responsable de la respuesta vascular al *shear stress* (**Figura 4**). En el endotelio hay unos 600 genes diferentes regulables por el flujo.

Un flujo laminar resulta en un aumento de expresión de genes anti-inflamatorios y anti-oxidativos y un flujo turbulento produce lo opuesto. Varios micro

RNAs (miRNA) participan de estos mecanismos formando un complejo con su RNA blanco y silenciándolo a través de su degradación o suprimiendo la transcripción. Un micro RNA es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia. Genes con funciones claves del endotelio como angiogénesis, tono vascular y moléculas de adhesión son reguladas por miRNAs a través de mecanosensores que inician vías bioquímicas que regulan silenciamiento o transcripción de micro RNA.

Dos moléculas esenciales en la regulación de la función antitrombótica endotelial son los factores de transcripción *Krüppel-like factor 2 y 4* (KLF2, KLF4), regulables por miRNAs que, a su vez, están regulados por flujo laminar. El flujo laminar activa vías como MEF5/ ERK5/ MEF2 y *AMP activated protein kinase* (AMPK), las que confluyen en el aumento de transcripción de KLF2. El ERK 5 es una kinasa activada por mitógeno de especial interés por su participación en la formación de KLF2 (**Figura 5**). Protectores vasculares potenciales, como estatinas e hidroxicloloroquina, aumentan la activación de ERK5 y por, lo tanto, de KLF2. Las estatinas serían el agente farmacológico que podría mimetizar el efecto ateroprotector de un flujo laminar.

Funciones de KLF2:

- 1) regula la activación de genes como el de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el de la trombomodulina (TM), con acción anti-inflamatoria, antitrombótica y anti-oxidativa en el endotelio.
- 2) inhibe proteínas de adhesión como VCAM-1, selectina E, PAI-1 y expresión de factor tisular en endotelio.
- 3) regula la transcripción de miRNAs como miRNA-126, que resulta en aumento de *vascular endothelial growth factor* (VEGF). miRNA-23b inducido por KLF2 tiene efecto anti-inflamatorio bloqueando las vías de NF- κ B y MAPK8/JNK. miRNA-143 inhibe la transcripción de miRNA-21 con actividad pro inflamatoria mediada por PPAR α . PPAR α inhibe vías de NF- κ B y AP-1 (**Figura 6**).
- 4) disminuye la glucólisis en el endotelio, generando un mecanismo protector por los efectos anti-inflamatorios, antitrombóticos y antioxidantes

mediados por glucosa (**Figura 7**).

- 5) El flujo laminar reduce la capacidad proliferativa endotelial, previniendo la progresión del ciclo celular de G1 a S a través de KLF2 y miRNA-23b. Comparaciones directas demuestran *in vitro* que la exposición prolongada a un flujo laminar es incluso superior a las estatinas para inducir expresión mediada por KLF2 de eNOS y TM en endotelio. El mecanismo de inducción de KLF2 es mediado por disminución de la vía PI3K-AKT y aumento de estabilidad de RNAm, que resulta en mayor cantidad de proteína KLF2.

El flujo turbulento disminuye KLF2 a través de miRNA-92a y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el endotelio. El estado redox de la célula endotelial está mediada sobre todo por NADPH oxidasa (NOX) y eNOS. El flujo turbulento aumenta la expresión de endotelina-1 (ET-1) y resulta en un aumento significativo de secreción endotelial de citoquinas proinflamatorias mediadas por NF- κ B y de aumento de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, *monocyte chemoattractant protein* (MCP) y E selectina. El flujo turbulento aumenta especies reactivas de oxígeno y esto activa la proliferación y división de células endoteliales. Esto coincide con la observación de que las placas ateroscleróticas se localizan primordialmente en las bifurcaciones vasculares, con flujo turbulento.

Dos ejemplos dan cuenta de la relevancia clínica del factor de transcripción KLF2:

- TNF α provoca propiedades adhesivas y pro-trombóticas al endotelio a través de la disminución de KLF2, TM y e-NOS, como lo demuestra el cultivo estático de HUVEC frente a TNF α . Si se agrega flujo laminar al sistema, aun con TNF α , se mantienen los niveles altos de RNAm para KLF2, eNOS y TM, mientras que la lovastatina en el medio no logra esos efectos protectores.
- el otro ejemplo es por la activación endotelial que producen los anticuerpos antifosfolípidos (APLA) y que está modulada por KLF2. APLA/anti- β_2 glicoproteínaI se asocian a menor expresión de KLFs que, a su vez, permiten una mayor activación celular mediada por NF- κ B. APLA/anti- β_2 GPI reduce la expresión de KLF2 o KLF4. La inhibición de NF- κ B por

KLFs refleja el secuestro de su co-activador transcripcional CBP/p300, lo que hace a este cofactor no disponible para NF-κB. La respuesta endotelial a APLA/ anti-β2GPI es el reflejo de una competición entre KLFs y NF-κB por su cofactor común, CBP/ p300.

El *shear stress* modula también la permeabilidad y la integridad del endotelio regulando, a través de miRNAs, proteínas de las zonas de unión intercelular (*junctional*) como conexinas y cadherina VE.

Los patrones de flujo también inducen distintas morfologías en la célula endotelial. Un flujo turbulento resulta en células endoteliales redondeadas con filamentos de actina cortos y localizados sobre todo periféricamente, mientras que el flujo laminar induce células elongadas, alineadas en la dirección del flujo con fibras paralelas de actina bien organizadas. Esta reorganización del citoesqueleto está mediada por miRNA-155.

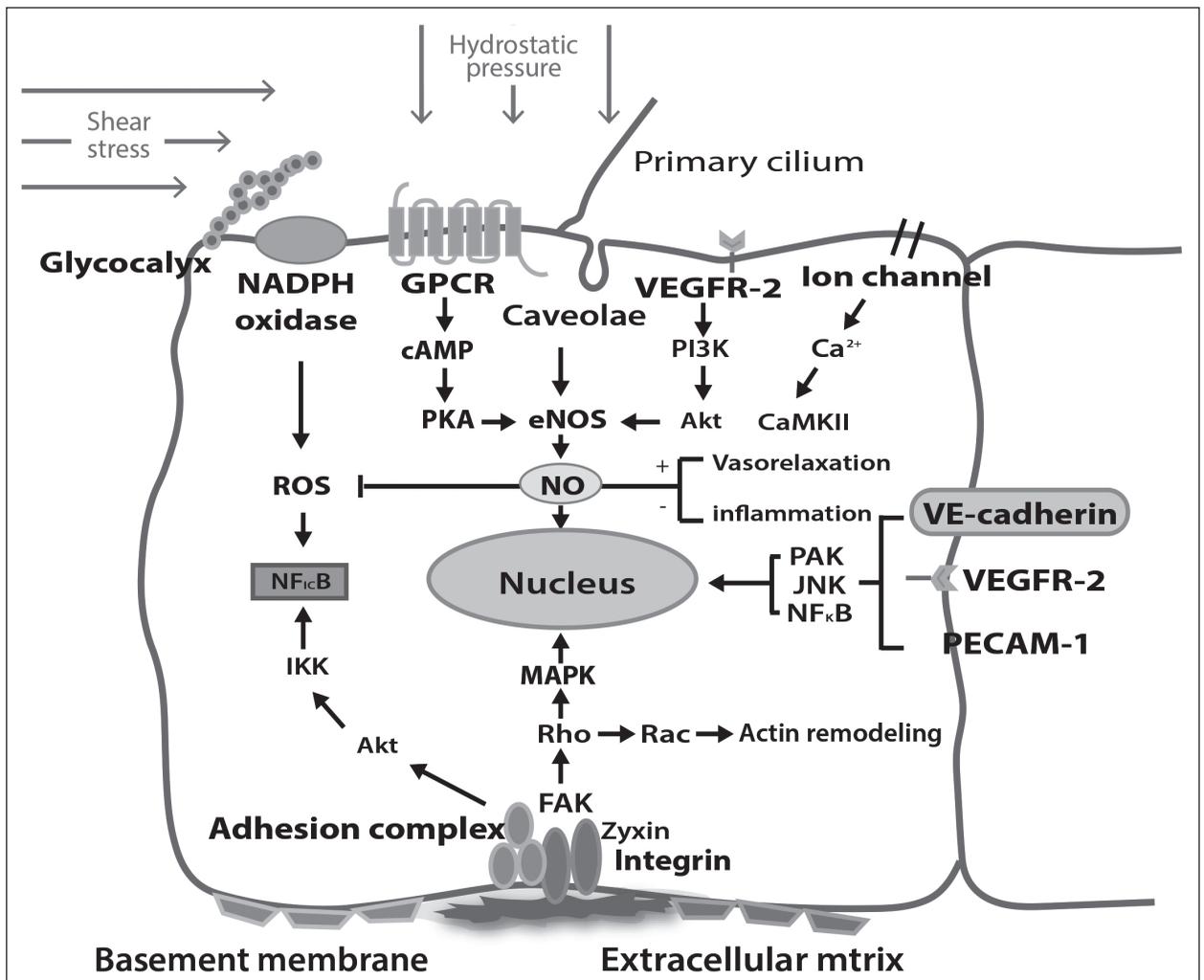


Figura 4. Sensores de mecano-transducción endotelial. Tomado de Deng QP et al. *Life Sci.* 2014; 57: 755.

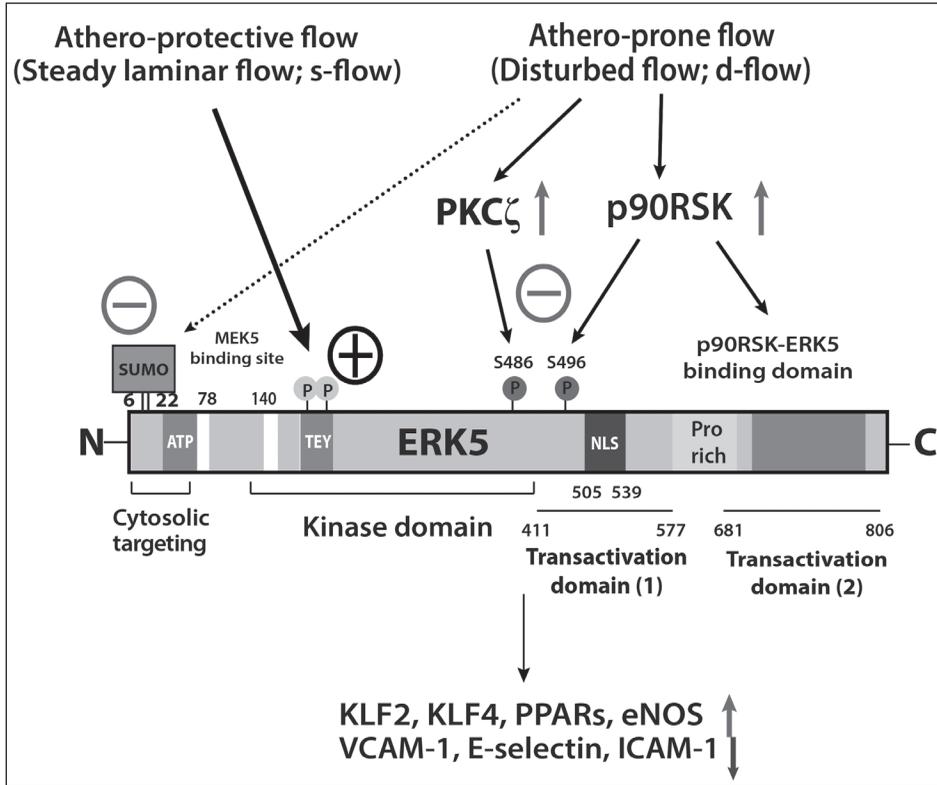


Figura 5. ERK-5 activador de KLF2. Tomado de Abe J et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34: 2378.

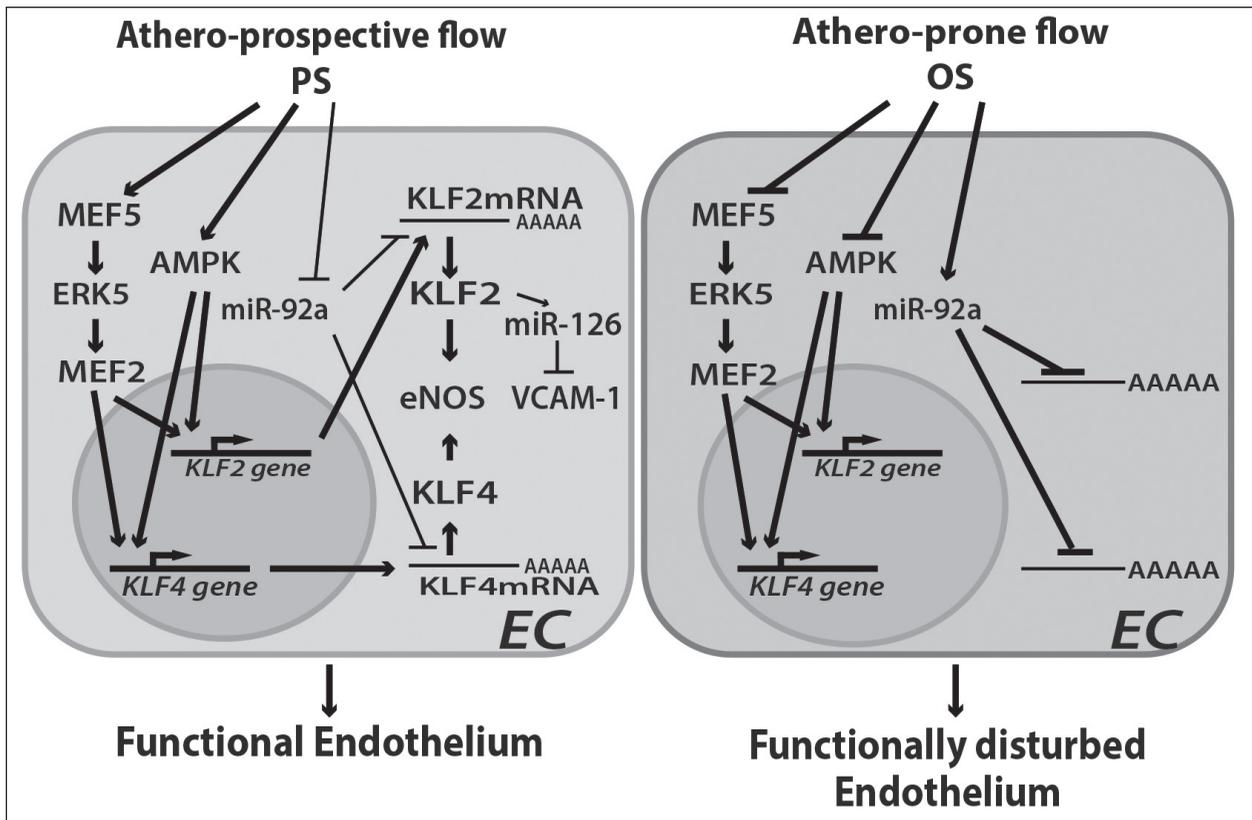


Figura 6. KLF2 y miRNAs. Tomado de Marin T et al. *Free Radic Biol Med.* 2013; 64: 61.

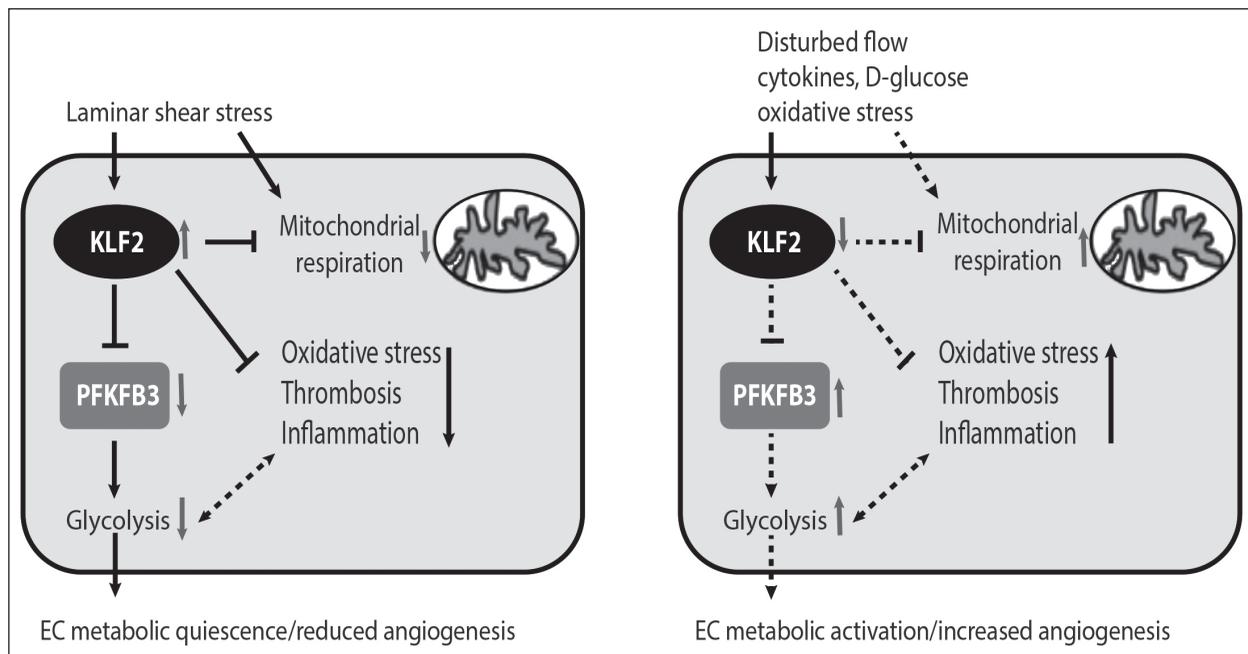


Figura 7. KLF2 y disminución de la glucólisis endotelial como mediador de efectos anti-inflamatorios, antitrombóticos y anti-oxidantes. Tomado de Sun X et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 13.

5. ¿Qué ocurre en el endotelio que envejece?⁽¹⁹⁻²¹⁾

En “*As you like it*”, Shakespeare define a la vejez como “Una segunda infancia, un mero olvido; sin dientes, sin ojos, sin gusto, sin nada”. No hay aspectos positivos para el Bardo en el devenir de los años.

Las estadísticas epidemiológicas en patología tromboembólica están de acuerdo con esta noción. Más allá de que las comorbilidades, que son factores de riesgo para trombosis, se vuelven más frecuentes con el envejecimiento (hipertensión, sedentarismo, diabetes, hipercolesterolemia, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal crónica, cirugías ortopédicas mayores, neoplasias, hiper homocisteinemia, etc.), la edad, *per se*, aumenta el riesgo trombótico en forma independiente. En el tromboembolismo venoso (TEV), el riesgo se incrementa a partir de los 40 años, y a partir de la siguiente década, se duplica cada 10 años, superando el 1% en mayores de 75 años. En enfermedad coronaria, la relación entre los otros factores de riesgo clásico y la edad explican un tercio del aumento de riesgo de cardiopatía isquémica en los hombres y una mitad en las mujeres en el grupo de 50-64 años respecto del grupo 25 a 49 años. Las dos asociaciones más importantes relacionadas a la edad son la hipertensión sistólica y la disminución de la relación colesterol HDL/ total,

seguidos del aumento de índice de masa corporal y prevalencia de diabetes mellitus. En el ACV isquémico la edad es el factor de riesgo más importante. A partir de los 55 años, por cada década de vida, la tasa de ACV se duplica. La incidencia anual en hombres es 25% mayor que en mujeres pero, por la mayor longevidad de ellas, más mujeres que hombres fallecen anualmente de un ACV. En fibrilación auricular (FA) la prevalencia de enfermedad aumenta de 5% en mayores de 65 años a 10% en mayores de 80 años. A su vez, la probabilidad de que la FA provoque ACV aumenta del 6% en menores de 60 años a 22% en el período 80-84 años. El aumento de riesgo por década en FA es 1.40. Finalmente, en enfermedad vascular periférica (carotídea, aórtica abdominal o de miembros inferiores), la prevalencia aumenta con la edad desde 1.6% en menores de 40 años a 21.1% en mayores de 80. La edad es el mayor predictor de cualquier tipo en enfermedad vascular periférica (OR para cada década 1.91).

¿Cuáles son las principales alteraciones en el endotelio que envejece?

La disfunción endotelial se caracteriza por una reducción de la producción de vasodilatadores (sobre todo óxido nítrico) con un aumento relativo de vasoconstrictores (endotelina-1 y prostanoides vasoconstrictores). Esto se acompaña de una dis-

minución de las funciones trombo-resistentes, fibrinolíticas, anti-inflamatorias y anti-proliferativas del endotelio. Las alteraciones relacionadas con la edad se potencian en presencia de factores de riesgo cardiovascular modificables como sedentarismo, hiperglucemia, resistencia a la insulina, obesidad, dislipemias, hipertensión y glomérulo-esclerosis. El endotelio en senescencia ha tenido un número limitado de divisiones celulares y ya no puede reemplazar a células injuriadas en estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo, con aumento de moléculas de adhesión para leucocitos y mayor permeabilidad.

Factores principales de disfunción endotelial provocados por la edad

a) **ESTRÉS OXIDATIVO.** Está dado por un desequilibrio entre la producción de agentes oxidantes y sistemas de metabolización o secuestro de los mismos. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con un electrón libre en su órbita externa, lo que les da inestabilidad y una energía que está dirigida a moléculas vecinas, especialmente proteínas, DNA y lípidos. En su mayoría los radicales libres provienen del oxígeno y se agrupan como especies reactivas de oxígeno (ROS). Su principal efecto nocivo es la reducción de disponibilidad de óxido nítrico (ON). Éste se forma por eNOS a partir de arginina y un cofactor, BH4. Más que una disminución de producción, el ON disminuye por inactivación por un anión superóxido. La NADPH-oxidasa es la enzima principal en la producción de anión superóxido. Éste reacciona con el ON generando peroxi-nitrito (ONOO-) que produce nitración de proteínas y peroxidación lipídica. Por este mecanismo se inhiben reguladores de la vasodilatación como los canales iónicos. Sobre DNA, ONOO- produce rupturas que activan mecanismos de reparación de DNA. ONOO- oxida BH4, produciendo un desacoplamiento de eNOS que pasa a producir superóxido en lugar de ON. La peroxidación lipídica por ONOO- altera la fluidez de membranas lipídicas. Por otra parte, los mecanismos antioxidantes endoteliales como glutatión-peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, heme oxigenasa-1 y NADPH óxido-reductasa quinona (NQO-1) no compensan el aumento de estos radicales libres. ONOO- inhibe superóxido dismutasa mitocondrial y se ha hallado disminuida la actividad enzimática de gluta-

tion-peroxidasa en cultivos de células endoteliales de sujetos de edad avanzada. El Nrf2 (factor nuclear eritroide2) es un factor de transcripción que defiende del estrés oxidativo. Normalmente se encuentra en el citoplasma unido a un represor Keap 1 (*Kelch-like ECH-associated protein1*). Los radicales derivados del oxígeno liberan esta unión y traslocan Nrf2 al núcleo donde regula expresión de enzimas antioxidantes como NQO-1, glutatión-S transferasa, glutatión peroxidasa y hemo-oxigenasa. En diabetes se ha observado disminución de actividad de Nrf2 (**Figura 8**).

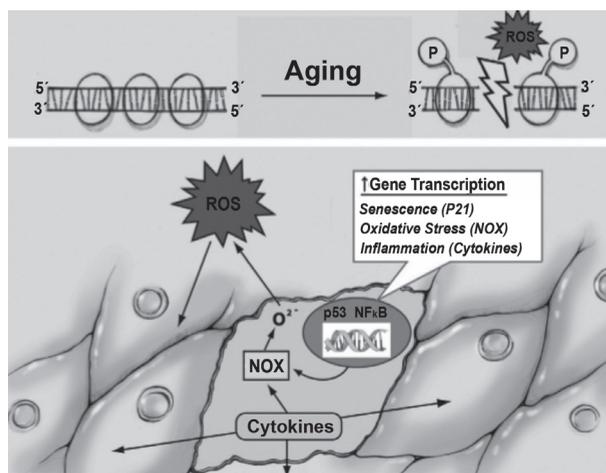


Figura 8. Relación entre estrés oxidativo, inflamación y senescencia endotelial. Tomado de Donato AJ et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 89: 122.

b) **INFLAMACIÓN.** La aterotrombosis es una enfermedad inflamatoria mediada por macrófagos activados de la placa arterial que liberan citoquinas con capacidad lesional. Marcadores de inflamación como proteína C reactiva de alta sensibilidad correlacionan con la actividad pro-trombótica de placas coronarias y la evolución clínica de los síndromes coronarios agudos. El aumento de ciclo-oxigenasa induce producción de radicales libres y de mediadores como IL-1B, IL-6 y TNF α . Estos mediadores y el estrés oxidativo actúan activando NF- κ B. Este factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y se ubica normalmente en el citoplasma gracias a la unión con proteínas inhibitorias I κ B. Diversos estímulos activan kinasas IKK- α y IKK- β que fosforilan I κ B y producen su degradación en el proteosoma. Esto deja libre NF- κ B para traslocarse

al núcleo e inducir citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, *lipoxigenase*, iNOS, y moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, PECAM, E-selectina). La mayoría de estas moléculas perpetúan el ciclo de inflamación y mayor activación de NF- κ B. Otras vías pro-inflamatorias no dependientes de NF- κ B que median aumento de permeabilidad endotelial son la activación del factor de ribosilación del ADP 6 (ARF6), su activador ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*) y la GTPasa Rac. Esta vía ARF6-ARNO-Rac provoca disrupción de los sitios de contacto estrecho entre células del endotelio y disrupción en los mecanismos de barrera endotelial. Se ha hallado asimismo participación de señales de marcas (Notch) en regiones arte-

rioscleróticas aórticas.

- c) AUMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES SENESCENTES. Esto ocurre con células en G0/G1 con DNA dañado por exceso de productos intracelulares nocivos como ROS, que activan p16/*retinoblastoma-like protein 1* (pRB) o p53 por disfunción telomérica. Se ha demostrado aumento de estas células en placas ateroscleróticas y en aneurismas aórticos. Las células senescentes tienen un fenotipo metabólico proinflamatorio y pro-oxidativo llamado SASP (*senescence-associated secretory phenotype*). En él se asocian mecanismos inflamatorios promovidos por NF- κ B y oxidativos por mayor generación de ROS mitocondrial (**Figura 9**).

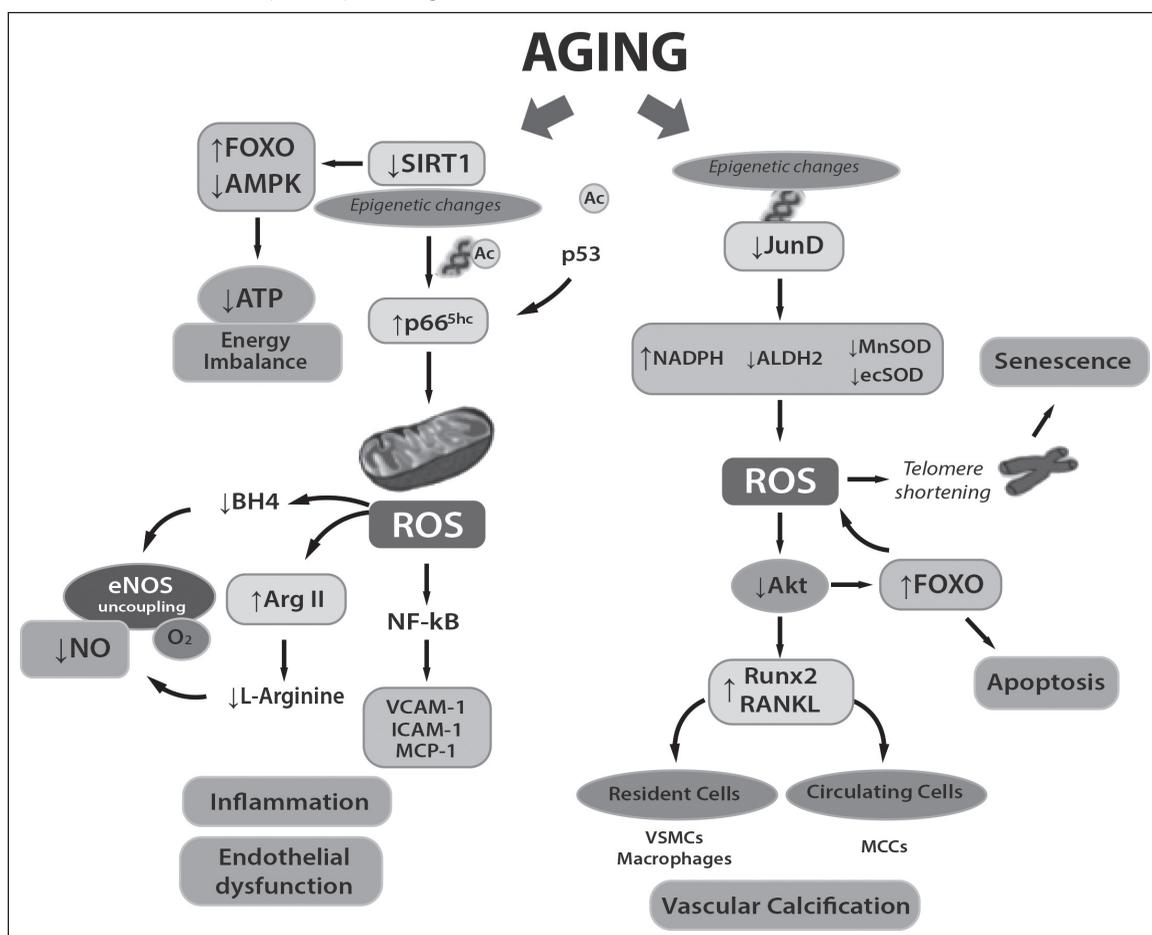


Figura 9. Vías moleculares que participan de la senescencia celular en el endotelio vascular. Tomado de Paneni F et al. *Clin Sci.* 2015; 128: 69-79.

- d) DISFUNCIÓN TELOMÉRICA inducida por estrés oxidativo y mecánico. Esto lleva a activación de p53 y senescencia. p53 produce además cambios en tres vías relacionadas con sensores de energía ce-

lulares: SIRT-1, AMPK y m-TOR.

- 1) Las SIRTuinas son una familia de proteínas que actúan en núcleo, citoplasma y mitocondrias. La principal es la 1, con expresión nu-

clear en relación con la restricción calórica. Produce deacetilación de una serie de factores de transcripción que llevan a una disminución de inflamación y estrés oxidativo. SIRT-1 deacetila p53 y lo inactiva, aumentando la supervivencia celular. Inversamente, su disminución en el endotelio añoso activa p53. También aumenta eNOS. SIRT-1 se ha hallado reducida en relación con la edad y es el sitio de acción no exclusivo de resveratrol y polifenoles del vino tinto. Este es un sitio potencial para la activación de SIRT-1 con pequeñas moléculas para revertir disfunción endotelial.

- 2) AMPK es una quinasa activada por aumento de AMP/ATP que regula el balance energético con la resistencia al estrés. La activación de AMPK resulta en aumento de eNOS, reducción de estrés oxidativo independiente de ON y diferenciación de progenitores de células endoteliales. Es uno de los múltiples blancos de la metformina. AMPK fosforila p53 y reduce inflamación celular.
- 3) m-TOR es una proteína de señalización que responde a aminoácidos y a insulina modificando la síntesis proteica y el crecimiento celular, a través de RNAm. La señalización por m-TOR está aumentada en endotelio arterial disfuncionante de roedores añosos. p53 inhibe m-TOR. La disminución de esta señal por rapamicina o restricción calórica aumentan la producción de ON.
- e) CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN JUNB. JunB es un factor de transcripción que regula la mayoría de los actores principales responsables de disfunción endotelial. En estado activo aumenta superóxido dismutasa y aldehído deshidrogenasa mitocondrial, aumenta la transcripción de eNOS y previene excesiva actividad de NADPH. La edad se asocia a hipermetilación en su promotor, lo que redundaría en disfunción endotelial. El ratón JunB^{-/-} tiene sobre-regulación de p53, disminución de telomerasa y daño mitocondrial.

6. ¿Qué aspectos biológicos de la trombina merecen enfatizarse para tratar de comprender mejor el sistema de coagulación?⁽²²⁻²⁹⁾

La ambición es el deseo desordenado por el poder, dice Spinoza. Macbeth es el ejemplo de una ambi-

ción que destruye todos los valores preciosos para un ser humano que cumple con las leyes de la Naturaleza. Macbeth dice en el comienzo de la obra: "¡Si el destino ha decretado que sea rey, ¡bien!, que se me corone, sin que tenga yo parte en ello!". Su esposa, al revelarse la profecía de las brujas, azuza sus ambición con: "Cuando os atrevíais a ello, entonces erais un hombre; y más que hombre seríais si a más os atrevieseis", instigándolo a matar al buen rey Duncan.

La trombina es la más "ambiciosa" de las serino-proteasas del sistema de coagulación. Fue descrita en 1892 por Alexander Schmidt y es la única entre las serino-proteasas de coagulación que, al perder sus dominios Gla, puede abandonar su sitio de génesis y difundir en el trombo en formación donde se le ofrecen múltiples sustratos. El mismo nombre del sistema en el que reina (coagulación) indica, quizá no en forma totalmente veraz, que su principal función es convertir el fibrinógeno en fibrina, la cual al polimerizar refuerza el trombo plaquetario de la hemostasia primaria. Como se señala en los capítulos previos, la generación de trombina es la clave de la hemostasia y la trombosis y su principal blanco farmacológico en la actualidad. La trombina que se genera es dependiente de la concentración de factores e inhibidores.

Los primeros oscilan en el rango normal entre 50 y 150% y acorde a esto, la capacidad de generación de trombina varía de individuo en individuo con un coeficiente de variación semejante al del peso en la población normal (~16%). Incluso en descensos muy marcados de un solo factor de coagulación como en la hemofilia severa, esta variación en la capacidad de generar trombina puede alterar el fenotipo de sangrado, de severo a moderado, por lo que puede no haber una correlación estricta entre nivel de FVIII y severidad de la expresión clínica. La trombina no sólo genera fibrina, sino que modifica las propiedades físicas de esa malla a través de la activación del factor XIII y su posibilidad de ser lisada aumentando t-PA y PAI1 y generando TAFI. En forma similar a esta ambigua relación con la fibrinólisis, la trombina también es un rey de dos caras con respecto a los cofactores V y VIII. Los activa en un círculo de retroalimentación positivo que amplifica su propia generación y los inactiva al generar proteína C activada cuando se une a trombomodulina endotelial. Respecto del FXI, la trombina tiene un

papel activador de retroalimentación similar al que cumple con los cofactores V y VIII y probablemente más fisiológico que la activación de FXI por FXIIa. Normalmente existe un nivel circulante de marcadores biológicos de generación de trombina como fragmento 1.2 de protrombina y complejos trombina-antitrombina en baja concentración, que aumentan progresivamente con la edad. Poco se conoce sobre qué genera este nivel estable y pequeño de generación de trombina, similar al del piloto de un calefón. ¿Está destinado a funciones no procoagulantes como regulación del tono vascular o de funciones endoteliales? ¿Es una manera de tener templado el sistema para activarlo más fácilmente en caso de requerimiento súbito de acciones hemostáticas? ¿Es un recurso para mantener niveles circulantes de proteína C activada de efecto anticoagulante a través de la trombomodulina y EPCR?

Si se infunde trombina en altas concentraciones (>70 U/kg) y en bolo se producen en modelos animales microtrombos, especialmente en pulmón, riñón, ventrículo izquierdo, hígado y arterias coronarias. Sin embargo, cuando se infunde trombina lentamente (0.9–1.6 U/kg/min en 2-5 horas), no se observa trombosis sino sangrado, lo que demuestra que concentraciones bajas, sin daño endotelial, provocan mayor acción de trombina sobre trombomodulina-PCa y activación fibrinolítica que producción de fibrina.

La trombina se comunica con las estructuras celulares vecinas a través de los receptores activados por proteasas (PARs). Esta propiedad la comparte con FXa. Los PARs son una familia de receptores con

siete rulos transmembrana acoplados a proteínas G (**Figura 11**). La trombina activa PAR-1, 3 y 4. Sobre plaquetas la activación de PAR-1 es un potente agente para la generación de superficies fosfolipídicas, permitiendo el ensamble de complejos tenasa y protrombinasa en la fase de amplificación de la coagulación. Las concentraciones de trombina necesarias para activar PAR-1 en plaquetas son menores que las requeridas para activar el sistema de coagulación. Concentraciones mayores son necesarias para activar PAR-4 plaquetario. La trombina también se une a GPIb plaquetaria. Los mismos receptores explican la interacción de trombina con endotelio, células musculares lisas, monocitos, mastocitos, linfocitos T y fibroblastos.

La trombina es pro-inflamatoria y favorece la proliferación celular y la migración leucocitaria. Altera la permeabilidad, el tono vascular y la angiogénesis por sobre-regulación de receptores de VEGF en endotelio. La disfunción endotelial inducida por trombina produce un fenotipo pro-inflamatorio importante en la patología trombótica arterial y venosa. La trombina aumenta las proteínas de adhesión entre endotelio, plaquetas, células tumorales y matriz extracelular a la vez que aumenta la producción de factores de crecimiento y quemoquinas promotoras de proliferación y migración de células neoplásicas. Asimismo facilita la metástasis activando colagenasas de tipo IV y metaloproteinasas que provocan disrupción de las membranas basales vasculares. Lo anterior explica el peor pronóstico vital de la enfermedad neoplásica complicada por tromboembolismo venoso.

Tabla 1. Propiedades de la trombina

Propiedades pro coagulantes	<ol style="list-style-type: none"> 1) Clivaje de fibrinopéptidos A y B 2) Activación de FV, VIII, XI y XIII 3) En plaquetas: inducción de agregación, secreción de gránulos y actividad procoagulante de fosfolípidos de membrana 4) Expresión de P selectina endotelial 5) Expresión de PAF endotelial (<i>platelet activating factor</i>)
Propiedades anti coagulantes	<ol style="list-style-type: none"> 1) Unión a trombomodulina y activación de PC 2) Disminución de unión de FvW a GPIb
Propiedades anti fibrinolíticas	<ol style="list-style-type: none"> 1) Activación de TAFI 2) Liberación de PAI 1

Propiedades pro fibrinolíticas	Liberación de t-PA
Propiedades pro inflamatorias	1) Aumento de CD40L e inducción de IL6, IL8 y MCP-1 2) Aumento de IL-1 β , TNF α , IL11 por endotoxina 3) Degranulación de mastocitos 4) Aumento de adherencia leucocitaria vía ICAM-1 5) Activación endotelial vía PAR-1 y PAR-4 6) Aumento de permeabilidad endotelial

¿Cómo reconoce la trombina sus diferentes sustratos? Hay dos zonas en la molécula para reconocer las proteínas a clivar y alinearlas para interactuar con el centro activo. Reaccionan contra proteínas o glicoproteínas de carga negativa y se denominan por lo tanto *anion binding exosites 1 y 2*. (Figura 10). *Macbeth reina por el terror y el asesinato hasta que Macduff, otro noble escocés, lo mata a pesar de las profecías presuntamente negativas por las que las brujas reducían la posibilidad de este evento (que un bosque invadiera su castillo, y que sólo moriría a manos de un hombre no concebido por una mujer)*. ¿Cómo inhibir una proteasa tan ambiciosa? Para inhibir a la trombina más de un Macduff es necesario. Las serpinas son las proteínas encargadas de esta tarea. De las 36 serpinas del genoma humano, 4 son los inhibidores fisiológicos de la trombina: a) antitrombina (AT) antes llamada antitrombina III

(ATIII), b) cofactor II de la heparina (HCII), c) inhibidor de la proteína C (PCI) y d) la proteasa nexina-1 (PN1). Las serpinas son potenciadas en su acción por glicosaminoglicanos (GAGs). Éstos poseen un pentasacárido de unión a AT. Los de más de 18 moléculas forman un mecanismo de templado que aumenta 1000 veces la efectividad de AT formando un complejo ternario. Todas las serpinas se ofrecen como sustrato preferencial a la trombina y forman un complejo estable con el centro activo de ésta. El complejo pierde la afinidad de los *anion binding exosites* de la trombina por otros sustratos y circulan hasta depurarse por receptor de lipoproteína hepático. La principal inhibidora de trombina es la AT que permite una vida media de sólo 30 segundos para la trombina libre en solución y no protegida por sus diferentes ligandos en los *anion binding exosites*.

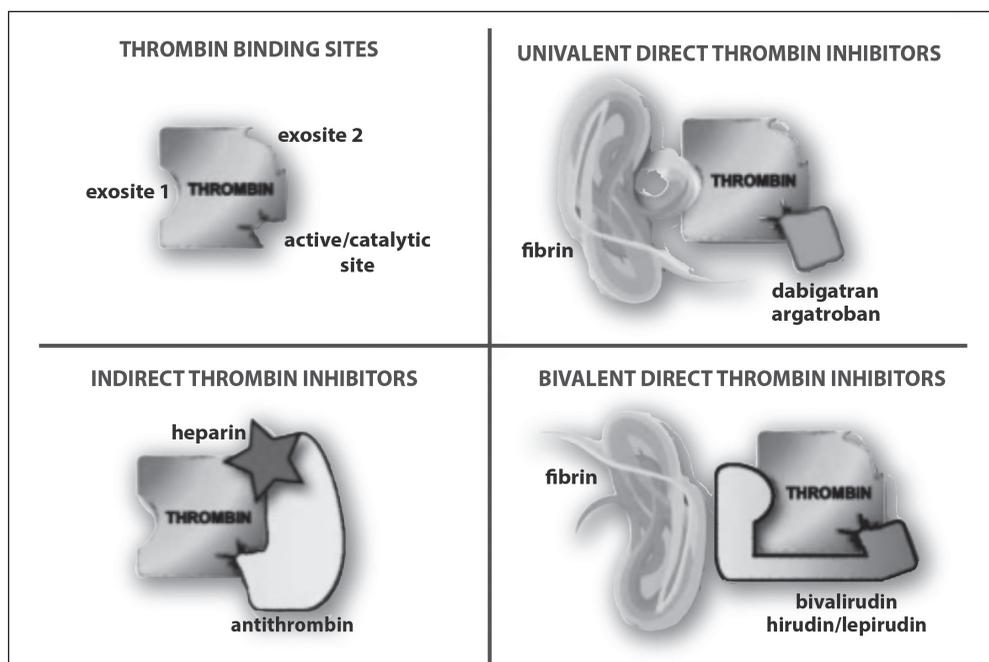


Figura 10. Sitios de reconocimiento de sustrato y centro activo de la trombina. Tomado de Siller-Matula JM et al. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 1020.

La PN-1 no es una proteína circulante sino de membrana de células musculares lisas o fibroblastos y el complejo con trombina es internalizado por la misma célula porque tiene similar receptor de lipoproteína. A nivel endotelial los GAGs como heparán sulfato se encuentran recubriendo su cara vascular y en la matriz subendotelial. La trombina unida a fibrina sobre todo en la parte del núcleo interno del trombo no es inhibible por AT por la escasa difusión proteica de esa área y la ausencia de GAGs endoteliales en esa área. La trombina libre que difunde hacia la periferia del trombo encuentra trombomodulina (TM) y GAGs. La TM es una proteína de membrana endotelial de 60 KDa, con carga negativa en los dominios extracelulares, especialmente en los semejantes a factor de crecimiento epidérmico 5 y 6 (EGF) que permiten la unión a trombina y en una región que contiene condroitin sulfato. En presencia de TM, la trombina tiene mayor afinidad por proteína C (PC) que por sustratos como fibrinógeno o PARs. La PC se halla unida a receptor endotelial de PC (EPCR), a su vez conectada a TM en los dominios EGF. La TM unida a trombina ejerce junto a EPCR propiedades anti-inflamatorias sobre el endotelio mediadas por PCa que cliva PAR-1. En forma opuesta a cuando es clivado por trombina libre, la señalización de PAR-1 por PCA-TM- EPCR- trombina, actúa a través de esfingosina 1-P y su receptor endotelial, contrarrestando el aumento de permeabilidad endotelial y aumentando la capacidad anti-apoptótica del endotelio (**Figura 12**). En forma similar a los complejos tenasa y protrombinasa, aunque con efecto opuesto sobre la coagulación, estas reacciones son posibles gracias a la proximidad de sustratos y enzimas sobre una superficie celular (no pueden tener esa efectividad las reacciones en solución). En capilares la EPCR es menos necesaria por la importante superficie endotelial pero en los grandes vasos es importante para ensamblar el complejo PC-TM-trombina y aumentar unas 20 veces la activación de PC. Sobre la membrana, la PC se asocia con su cofactor proteína S y cliva proteolíticamente a los factores FVa y VIIIa unidos a esa misma membrana (**Figura 13**). El FV no activado es cofactor de este clivaje del FVa por PC. Los sitios de clivaje de PCa sobre FVa son Arg 306, 506 y 679. El polimorfismo Gln506Arg que genera al FV de Leiden disminuye la acción de la PCa sobre el FVa, haciendo que el FV permanezca activo por más tiempo. Este hecho aumenta 4-7

veces (en la forma heterocigota) la probabilidad de primer episodio de TEV. Dado que no hay TM ni EPCR en la membrana plaquetaria, la PCa es mucho más efectiva para inhibir formación de protrombinasa sobre endotelio que sobre plaquetas. La TM unida a trombina funciona también disminuyendo la fibrinólisis. Por sus dominios tipo EGF 3-6 se une al zimógeno de TAFI (*thrombin activable fibrinolytic inhibitor*) y la trombina lo convierte en TAFIa. Esta carboxipeptidasa elimina residuos de lisina de la fibrina parcialmente degradada, por lo que se pierden los sitios de unión de plasminógeno y t-PA a fibrina. Esto aumenta la posibilidad de α_2 antiplasmina para inhibir a la plasmina al no estar unida a la fibrina. EPCR tiene también capacidad de remover FVIIa de la circulación, internalizándolo en endotelio. La unión FVIIa-FT a EPCR reduce la activación de FXa. La TM es clivada de la superficie endotelial por proteasas leucocitarias y metaloproteasas y circula en plasma, pudiendo considerarse un marcador de daño endotelial en sepsis y otras patologías. Pese a tan diversos moduladores e inhibidores, la trombina logra clivar sus sustratos principales ya durante la fase de latencia de la generación de trombina. Al producirse la coagulación, recién se inicia la propagación y explosión de trombina con generación de complejos T-AT. Previo a esto ya se ha logrado iniciar la activación por trombina de FXIII, FV, liberación de fibrinopéptidos A y B.

Finalmente, otra forma de secuestrar trombina está a cargo de uno de sus productos, la fibrina. Una variante común del fibrinógeno, entre el 8 y el 15% del total es el fibrinógeno γ' ($\gamma A/\gamma'$), que se produce por un corte alternativo del mRNA para cadena γ . Esto le brinda una alta proporción de residuos de carga negativa con mayor afinidad para *exosites binding sites* de trombina que, unida al fibrinógeno, es menos inhibible por AT y HCII. Esta propiedad de secuestro de trombina se denominó AT I. La liberación de FP B está disminuida en ese fibrinógeno y esto produce una malla de fibrina con fibras más finas y ramificadas y aumento de resistencia a la fibrinólisis. Aumento de fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ se ha hallado en trombosis arteriales (coronarias y ACV). La calidad de la malla de fibrina, su espesor, elasticidad y resistencia a la lisis son proporcionales a la cantidad de trombina generada.

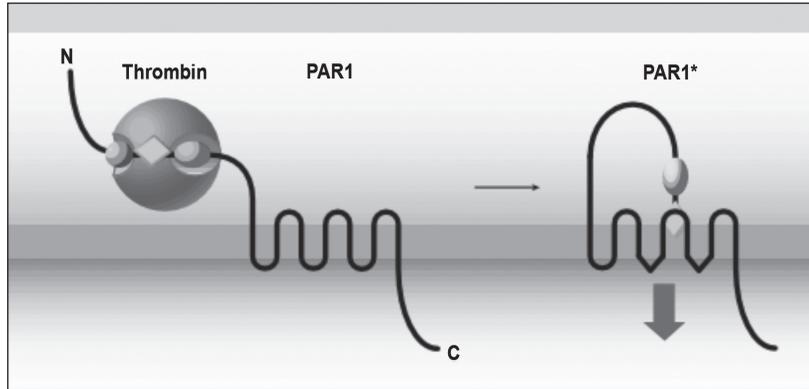


Figura 11. Neo-ligando tipo candado producido por el clivaje Arg41-Ser42 en receptor PAR. Tomado de Coughlin Sh. *Nature*. 2000; 407: 258.

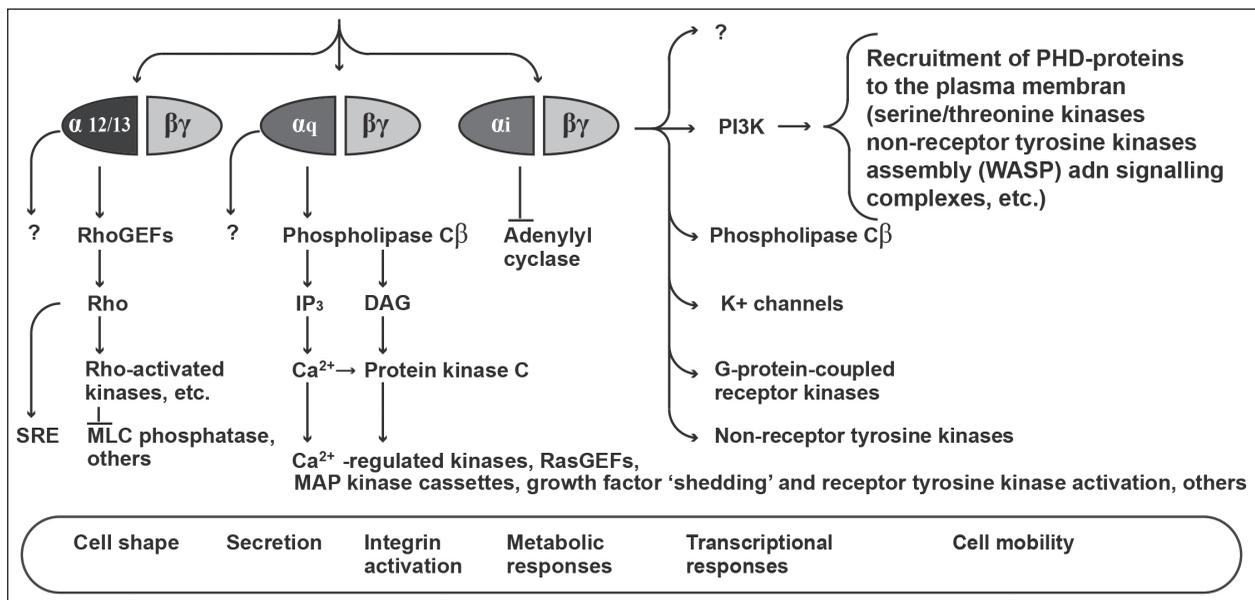


Figura 12. Señalización intracelular de PARs. Tomado de Soh UK et al. *Br J Pharmacol*. 2010; 160: 191.

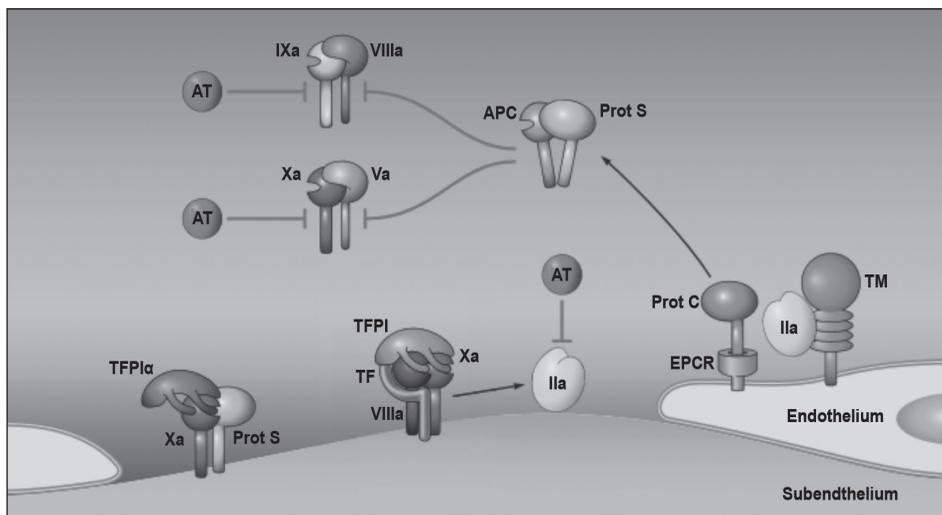


Figura 13. Inhibición de sistema de coagulación por TFPI, AT y TM-PC-PS. Tomado de Versteeg HH et al. *Physiol Rev*. 2013; 93: 327.

7. ¿Qué aportan los leucocitos al trombo?⁽³⁰⁻³¹⁾

Macbeth refleja un constante contraste entre las fuerzas del bien y del mal. El tirano y su esposa cautivados por la profecía y sometidos por la ambición recurren a la manipulación, el engaño y culminan en el asesinato y la falta de arrepentimiento. Malcolm y Macduff representan la fuerzas del bien que vienen a restablecer el orden natural interrumpido por la muerte del Rey Duncan. Hay pocos seres ambiguos en la obra.

Los leucocitos en el trombo, como veremos, aportan a ambos polos éticos dentro de la fisiopatología. ¿Cómo llegan los PMN al trombo? Las plaquetas activadas en el núcleo del trombo expresan P selectina y en el caso de endotelio activado, éste expresa E selectina. El gradiente de ambos productos es desde el centro a la periferia del trombo, por lo que el reclutamiento leucocitario tarda minutos. El ligando leucocitario para ambas selectinas es PSGL-1 expresado en las membranas de los PMN. Los PMN rotan y adhieren sobre plaquetas y endotelio activado y a su vez se activan expresando L selectina que atrae más PMN por el mismo ligando anterior. Tenemos, pues, un diálogo cruzado de endotelio-PMN, plaquetas-PMN y PMN-PMN. Este pegamiento debe consolidarse mediante señales de activación promovidas por P selectina que aumentan la afinidad de β_2 integrinas de PMN por sus ligandos. La adhesión más firme y que promueve señales intracelulares en PMN se logra por β_2 integrinas. Las β_2 integrinas tienen cuatro miembros, CD11a/CD18 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) (LFA-1), (α L β 2), CD11b/CD18 (*macrophage antigen-1*) (Mac-1), (α M β 2), (CR3), CD11c/CD18 (α X β 2, gp150/95, CR4) y CD11d/CD18 (α D β 2). Su interacción con ICAM-1 del endotelio activado permite además de adherencia estable, una trans migración por entre las células endoteliales. Mac-1 interactúa con C3bi para opsonización de patógenos, se une a fibrinógeno y a GPIb plaquetaria. La continuidad de PMN en el trombo a través de máxima activación de Mac-1 se potencia por otras moléculas producidas durante la conexión trombosis-inflamación. Estas son citoquinas, quemoquinas y otros quemoattractantes como PAF endotelial y plaquetario, PF4 plaquetario inmovilizado sobre GAGs del endotelio, CXCL7 (*neutrophil activating peptide*) (NAP)-2 cuyo precursor CTAPIII es de origen plaquetario y se activa por ca-

tepsina G de PMN activados (**Figura 14**).

Otra interacción entre plaquetas activadas y leucocitos lleva a la formación de NETs con la extrusión de DNA, RNA e histonas y proteasas leucocitarias al trombo en formación. El receptor plaquetario *Toll-like receptor 4* (TLR4) es el más importante en este proceso. La malla de DNA-histonas promueve más activación y reclutamiento plaquetario y co-localiza plaquetas con VWF, fibronectina y fibrinógeno, a la vez que activa F XII de la vía intrínseca junto con los polifosfatos liberados por las plaquetas que segregan su contenido granular. La formación de NETs promueve generación de F. tisular por PMN y la elastasa de los NETS inhibe TFPI lo que aumenta la actividad procoagulante por vía extrínseca. La elastasa también activa receptores plaquetarios. Histonas, mieloperoxidasa, elastasa y catepsina G no sólo promueven daño tisular sino también remodelación necesaria para la reparación tisular.

El 30% del infiltrado inflamatorio que se produce en los minutos posteriores a un trombo corresponde a monocitos. Éstos aportan micropartículas con F. tisular en agregados plaquetas-monocitos para el aspecto procoagulante. Su rol principal es el de la regresión de la trombosis a través de su aporte convertidos en macrófagos, de DNAsa y fibrinólisis por t-PA, u-PA y metalo-proteinasas. La acumulación de PMN y monocitos es mayor en condiciones de infección o de endotelio activado, sobre todo en las áreas de bajo *shear stress* en las que los PMN pueden adherirse más fácilmente. Esto se produce en áreas post-estenóticas en territorio arterial y en zonas de éstasis en las válvulas venosas de miembros inferiores. La resolución de un trombo puede acelerarse en modelos animales administrando quemoquinas como MCP-1 o IL-8 para estimular la actividad leucocitaria intra trombo, sin anticoagulación. En forma inversa, la inhibición de flujo de monocitos por delección genética de receptor cisteína-cisteína (CCR)-2 o cisteína-X cisteína (CXCR2) produce una disminución de la resolución del trombo.

En resumen, PMN y monocitos que emigran al trombo pueden tener acciones indeseadas de aumento de la capacidad de trombosis e inflamación como un papel beneficioso en la remodelación vascular y extravascular que acompaña a la reparación de la injuria tisular.

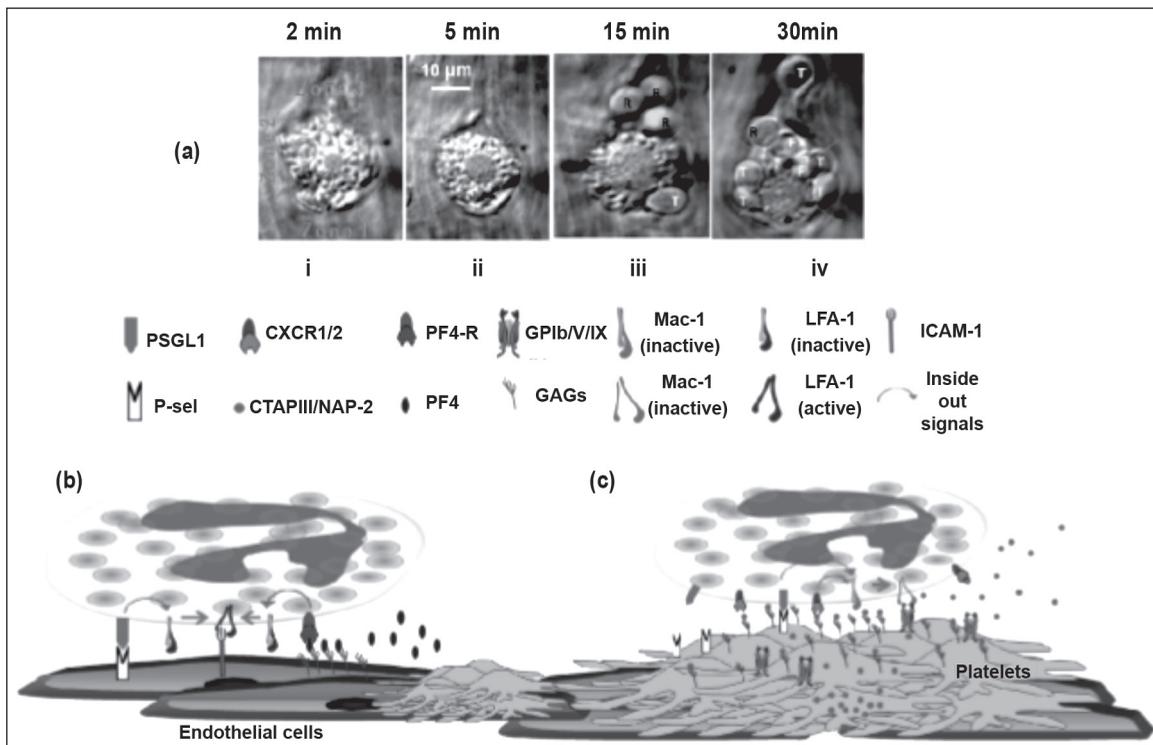


Figura 14. Mediadores de reclutamiento leucocitario al trombo. Tomado de Ghasemzadeh M et al. *Thromb Haemost.* 2015; 113: 1224.

8. ¿Qué aportan los eritrocitos al trombo?⁽³²⁻³⁶⁾

¿Qué sustancia es la tuya, qué te forma, que millones de sombras te acompañan?

Esto dice Shakeaspeare en un soneto que podríamos utilizar para analizar por qué un componente tan importante del volumen de un trombo ha pasado inadvertido hasta los últimos tiempos (**Figura 15**). Obviamente, la coagulación se ha estudiado siempre en plasma, lo cual ha excluido cualquier aporte del glóbulo rojo (GR) a la misma. A pesar de que en el trombo venoso el volumen aportado por los hematíes suele superar el esperable por el hematocrito, esto ha sido considerado siempre como un fenómeno pasivo, donde un espectador inocente como el eritrocito queda atrapado en la malla fibrino-plaquetaria sin contribuir al proceso trombótico. Estudios recientes revelan, sin embargo, que es necesario el entrecruzamiento por F XIIIa de cadenas α de fibrina y que no hay ligazón directa de GR a fibrina por FXIIIa.

El fenómeno de migración axial por el cual los hematíes empujan hacia el área endotelial a las plaquetas aumentando su probabilidad de ser útiles para la hemostasia ha sido el único aporte considerado por años a estos elementos que superan 10 a 20 veces el número de plaquetas circulantes.

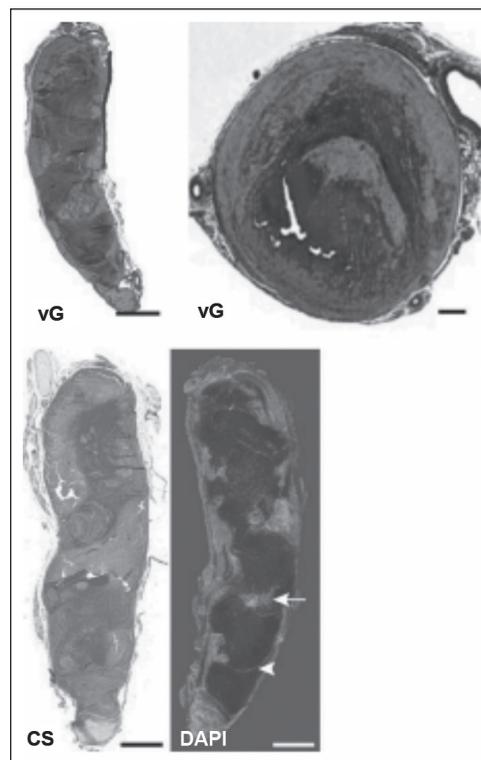


Figura 15. Contenido en hematíes de un trombo venoso producido por estasis. Las áreas claras son fibrino-plaquetarias y las flechas muestran leucocitos en el área blanca. Tomado de von Brül ML et al. *J Exp Med.* 2012; 4: 819.

En el área trombótica se conocen desde años los efectos del aumento de viscosidad en policitemia vera o en eritrocitosis por hipoxia o por deshidratación para producir estasis como factor procoagulante.

En los últimos años se ha descrito asociación de trombosis con patologías eritrocitarias donde se afecta la deformabilidad sea por membrana anormal, contenido anormal de calcio eritrocitario por menor ATP para el bombeo de protones o por alteración de Hb S que forma agregados o polímeros al desoxigenizarse (estomatocitosis, β talasemia, drepanocitosis, diabetes mellitus, etc).

Recientemente se ha identificado que los hematíes pueden proveer superficies fosfolipídicas con fosfatidilserina (PS) al fallar sus mecanismos normales de mantener la asimetría de fosfolípidos aniónicos de membrana por la actividad de flipasas y flopasas. *Shear stress* altos, daño eritrocitario por complemento o estrés oxidativo pueden activar la scramblasa y provocar pérdida de la asimetría fosfolipídica. Esto además favorece la liberación de micropartículas eritrocíticas con estos fosfolípidos y así aumentar la adhesividad del glóbulo rojo al endotelio. La población normal tiene un 0.5% de sus hematíes con fosfatidilserina en su superficie y hay unos 550 sitios de unión para protrombinasa por hematíe que exprese este fosfolípido de membrana. Estudios de potencial endógeno de generación de trombina muestran que es afectado por niveles crecientes de GR agregados a plasma pobre en plaquetas, en magnitud incluso superior al que aportan las mismas plaquetas. Los GR aislados tienen actividad de protrombinasa cuando se incuban con FXa y FVa. Sin embargo se ha demostrado que el producto principal es meizotrombina que podría estar dirigida a unirse a TM y activar PC, con lo cual la contribución del GR podría ser dual, pro y anticoagulante.

Otros hallazgos sugieren la capacidad de una enzima eritrocitaria de membrana símil elastasa para activar FIX directamente. Quizá tan relevante como el aporte de membranas con PS, sea la descripción de nuevas formas de adhesión del hematíe a endotelio, plaquetas o fibrinógeno. En drepanocitosis, las moléculas involucradas son la integrina $\alpha 4\beta 1$, CD44, glicoproteína del grupo sanguíneo Lutheran, CD36 (receptor de trombospondina), CD47 e ICAM4. En la malaria por *P. falciparum* la proteína PfEMP-1 del parásito se une ICAM1 endotelial produciendo la te-

mida complicación cerebral. En diabetes mellitus, el aumento de adherencia endotelial está mediado por la proteína banda 3 con exceso de productos avanzados terminales de glicosilación (AGEs). ICAM4 es una proteína de membrana eritrocitaria que es parte del complejo Rh. Se ha demostrado que se puede ligar a integrina $\alpha IIb\beta_3$ activada en la plaqueta. Esta asociación incrementa la capacidad trombogénica en modelos de trombosis venosa con bajo *shear stress* incrementando la producción de P selectina en la plaqueta adherida. La capacidad de GR de aumentar la activación plaquetaria por colágeno ex vivo generando la producción de tromboxano y la liberación de ADP ha sido estudiada durante mucho tiempo por el grupo de Aznar en Valencia.

Los hematíes intratrombo cumplirían otra función además de aumentar el volumen del mismo. Cuando se produce la retracción del coágulo cambia la permeabilidad del mismo y su rigidez, además de achicarse el volumen. Esto requiere miosina IIA y fibrina. Las patologías plaquetarias que involucran MYH9 tienen un fenotipo sangrador. La contracción fibrino-plaquetaria produce una pared compacta de hematíes que cambian a una forma poliédrica (polihedrocitos) de permeabilidad similar a un endotelio intacto y donde no penetran los activadores fibrinolíticos (**Figura 16**).

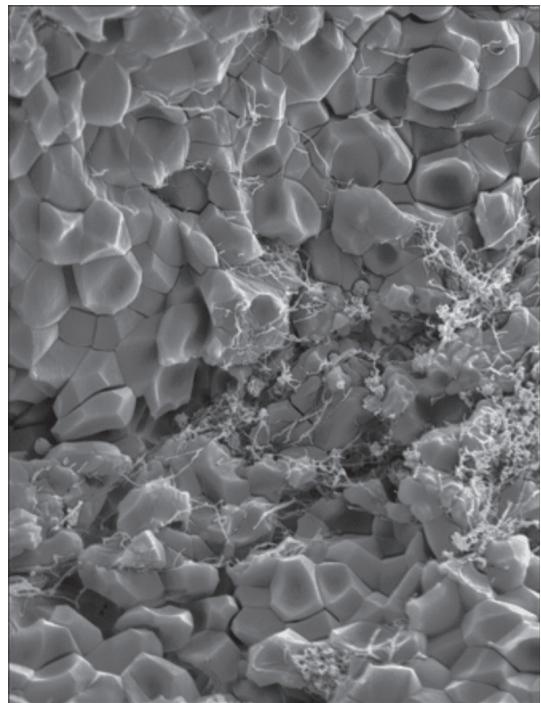


Figura 16. Estructura eritrocitaria en el trombo retraído. Tomado de Cines DB et al. *Blood*. 2014; 123: 1596.

9. ¿Es similar el trombo hemostático fisiológico al trombo venoso y al arterial?⁽³⁷⁻⁵²⁾

La formación del trombo hemostático se analizó en la pregunta 2. Brevemente, entonces, una disrupción endotelial expone colágeno y FVW del subendotelio provocando adhesión y activación plaquetaria, liberación de P selectina, exposición de PS en las plaquetas y activación del sistema de coagulación fundamentalmente por vía extrínseca, ya sea por F. tisular de las células subendoteliales del vaso dañado o circulante desencriptado o aportado por micropartículas o por monocitos atraídos al trombo. Los mecanismos inhibitorios naturales y de reparación por fibrinólisis u otras proteasas, circunscriben la lesión al espacio extravascular y remodelan el vaso dañado.

El trombo arterial tiene una patogénesis similar al hemostático, pero ocurre en territorio de alto *shear stress* y frecuentemente con capacidad aumentada de las plaquetas para ser activadas. Factores de riesgo como desequilibrios de colesterol LDL/HDL o productos avanzados de glicosilación provocan activación del receptor CD36 y del SRB-1 (*scavengers*). También son operativos el tabaquismo, el endotelio activado o el flujo perturbado por hipertensión arterial. Finalmente, la lesión vascular (desgarro de placa) es más severa que la del trombo hemostático y expone una superficie mucho más trombogénica que la del subendotelio o media de un vaso sano por su alto contenido en F. tisular. Las plaquetas se adhieren con más facilidad favorecidas por el *shear stress* alto de las áreas estenóticas. FVW-GPIIb es el primer eslabón de adhesión a esas velocidades de flujo, seguido por adhesión al colágeno (receptores $\alpha 2\beta 1$ and GPVI), a fibronectina (receptor $\alpha 5\beta 1$) y laminina (receptor $\alpha 6\beta 1$). La plaqueta produce al activarse varios agonistas solubles, sobre todo tromboxano A2 (TxA2) y ADP. El primero es producido por la conversión de ácido araquidónico a endoperóxidos por ciclo-oxigenasa y el posterior metabolismo a TxA2 por tromboxano-sintetasa. La liposolubilidad del TxA2 le permite difundir a través de membranas e inducir activación plaquetaria autocrina y paracrina por receptores asociados a proteína G. El ADP es hidrosoluble y estimula más activación plaquetaria por receptores P2Y1 y P2Y12. En la trombosis arterial el grado de activación de GPIIbIIIa es mayor por la mayor liberación de ADP y la mayor ocupación de receptores de FVW-GPIIbX. GPIIbIX, recep-

tor P2Y12 y GPIIbIIIa señalizan vía Src y PI3K β activando más receptores GPIIbIIIa y más exposición de PS en la membrana plaquetaria a través de vías diferentes de las de apoptosis. En la activación del sistema de coagulación participan no sólo la vía extrínseca, sino también la intrínseca por la activación de FXII por polifosfatos plaquetarios y por RNA e histonas leucocitarias. El colágeno de la placa actúa en forma indirecta a través de activación plaquetaria (**Figura 17**).

La participación plaquetaria primordial correlaciona con la efectividad de los tratamientos actuales inhibiendo ciclo-oxigenasa y P2Y12 o el empleo en hemodinamia de inhibidores de receptor GPIIbIIIa. La activación del sistema de coagulación es mayor en los síndromes coronarios agudos que en el ACV de origen arterial y eso da cuenta del uso de anticoagulantes sólo en la cardiopatía isquémica. En un meta-análisis sobre 191 estudios en enfermedad coronaria y trombofilia, el riesgo relativo de FV Leiden fue 1.17 y de protrombina 20210, 1.31 lo que avala la menor contribución de situación de hiper-coagulabilidad en la trombosis arterial con respecto a la trombosis venosa. Otros polimorfismos como PAI-1, FVII 10976A, GP Iba y GPIIIa no fueron contribuyentes al riesgo de enfermedad coronaria. La participación leucocitaria está confirmada por el hallazgo de nucleosomas de NETs circulantes en los pacientes con síndrome coronario, pero no hay aún aplicación clínica de ese concepto.

El tromboembolismo venoso reconoce aún 150 años después de Virchow al flujo lento, la hipercoagulabilidad y el daño de la pared vascular como sus causas principales. Inmovilidad, cirugías (especialmente ortopédica mayor de miembros inferiores) y enlentecimiento circulatorio por insuficiencia cardíaca son responsables del primer componente de la tríada. La hipoxia y el bajo *shear stress* producen fenotipo endotelial protrombótico y pro-inflamatorio. Micropartículas portadoras de factor tisular, especialmente en pacientes neoplásicos y activación leucocitaria con formación de NETs, contribuyen a generar el nido local trombótico en la zona de circulación más lenta localizada en las válvulas venosas de los miembros inferiores. La hipercoagulabilidad puede entenderse entonces como el producto de un aumento de micropartículas circulantes, aumento de concentración de factores de coagulación (protrombina 20210; FVIII, fibrinógeno) aumento de la acti-

vidad de factores (FV Leiden), déficit de inhibidores (AT, PC, PS), activación endotelial y activación de las plaquetas (síndrome antifosfolípido). El trombo venoso, pese a su inicio plaquetario y

leucocitario, se propaga como fibrino-eritrocitario. La prevención y el tratamiento tradicional para esta patología han sido por lo tanto realizadas por drogas anticoagulantes.

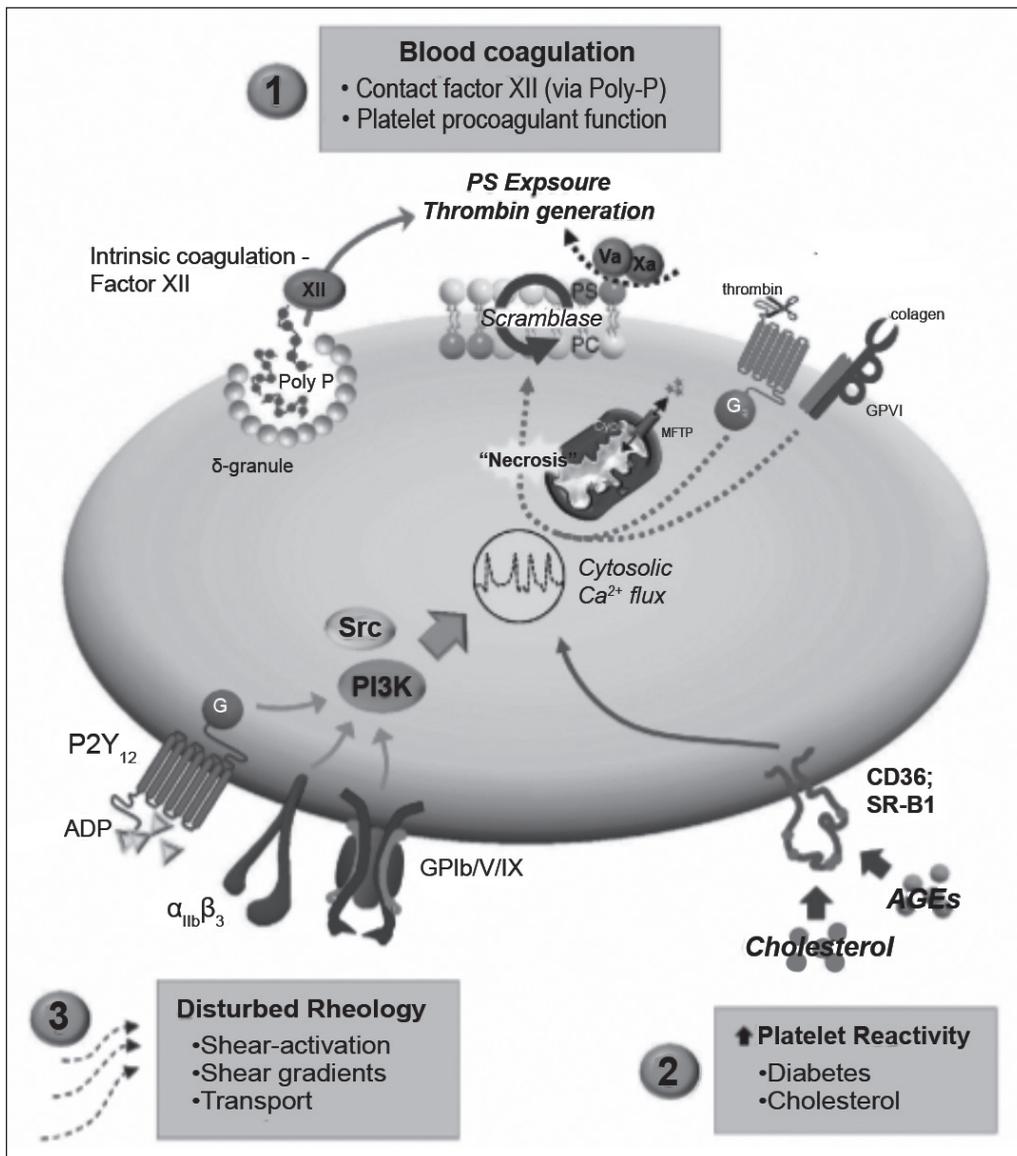


Figura 17. La plaqueta, mediador principal del trombo arterial y sus vías de activación. Tomado de McFadyen JD et al. *Thromb Haemost.* 2013; 110: 859.

10. ¿Qué implicancia terapéutica tienen los conceptos anteriores para la tarea asistencial?

Lady Macbeth le dice a su marido “Trata de parecerte a la flor inocente, pero realmente sé la serpiente que escondes”. Macbeth sigue su consejo al fingir sorpresa por la muerte de Duncan que él mismo perpetró o cuando les culpa a los prófugos hijos del Rey de la muerte de su padre. ¿Un personaje así puede producir un resultado diferente de una

tragedia? ¿Podríamos recobrar a Macbeth o a su esposa para el bien? ¿No sería preferible cambiar el curso de esa historia modificando la acción de personajes secundarios? Si por ejemplo, Duncan no hubiera concurrido a investir con su nuevo cargo a Macbeth, no habría sido muerto y no se hubiera concretado la maligna profecía de las brujas.

¿Si los personajes principales que intervienen en el trombo hemostático son los que participan del trom-

bo patológico arterial o venoso, será posible inhibirlos para tratar estas patologías tan prevalentes sin producir sangrado? La terapia antitrombótica actual tiene como blancos enzimas claves en la hemostasia como trombina (dabigatran y bivaliridina, heparina no fraccionada), FXa (xabanes, pentasacáridos, heparinas de bajo PM), zimógenos de FII, VII, IX y X (dicumarínicos), COX plaquetaria y endotelial (aspirina), receptor P2Y₁₂ plaquetario para ADP (tienopiridinas), PAR-1 plaquetario (vorapaxar), GP IIb/IIIa (abciximab, integrilin, eptifibatide). Todos ellos tienen efectividad antitrombótica al costo de aumentar el riesgo hemorrágico, ya que el personaje a suprimir es necesario para ambos tipos de trombos. ¿Qué perspectivas tenemos de hallar personajes suprimibles para la progresión del trombo patológico y que no se afecte el hemostático?

Dice el Bardo: “*Cuidado con la hoguera que enciendes contra tu enemigo; no sea que te chamusques a ti mismo*”.

Por lo anteriormente expuesto se desprende que hay diferencias entre el trombo hemostático y los que causan enfermedad y que hay personajes que participan fundamentalmente en éstos últimos. Polifosfatos activadores de FXII, FXI, I3PK β , P selectina, histonas y DNA, KLF2, son nuevos blancos terapéuticos a abordar en el futuro próximo, tratando de evitar la progresión trombótica sin afectar el núcleo central del trombo hemostático.

A poco más de 50 años de la cascada de MacFarlane, Davie y Ratnoff y a 500 años de la muerte de Shakespeare, el escenario está esperando nuevas interpretaciones de piezas tan fascinantes como la hemostasia y la dramaturgia del Bardo. Abordarlas con brevedad “*La brevedad es el alma del ingenio dice Hamlet*” no me ha resultado posible, estimado lector, y pido disculpas por ello.

Bibliografía

1. Hogan AK, Weiler H, Lord ST. Mouse models in coagulation. *Thromb Haemost.* 2002; 87: 563-74.
2. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med.* 2002;8:1175-1181.

3. Diamond SL. Systems Biology of Coagulation. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 224-232.
4. Travers RJ, Morrisey JH. Novel concepts for coagulation activation. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association.* 2015; 9: 57-62.
5. Geddings JE, Mackman. Recently identified factors that regulate Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 570-574.
6. Furie B. Pathogenesis of thrombosis. *Hematology.* 2009; 255-258.
7. Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A et al. Platelet in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J of Biomed Res.* 2015; 29: 437-444.
8. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia.* 2014; 20 (Suppl 4): 15-22.
9. Stalker TJ, Welsh JD, Brass LF. Shaping the platelet response to vascular injury. *Curr Opin Hematol.* 2014 ; 21: 410-417.
10. Laurance S, Lemarié CA, Blostein MD. Growth arrest-specific Gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv Nutr.* 2012; 3: 196-203.
11. Boulaftali Y, H0-Tin-Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L et al. Platelet Protease Nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation.* 2011; 123: 1326-1334.
12. Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood.* 2002; 99: 159-167.
13. Weyrich AS. *Hematology.* 2014; 400-403.
14. 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. *Antiox Redox Signal.* 2014; 20: 899-913.

15. Marin T, Gongol B, Chen Z, Woo B, Subramaniam S et al. Mechanosensitive microRNAs-role in endothelial responses to shear stress and redox state. *Free Radic Biol Med.* 2013; 64: 61-68.
16. van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RG, Rohlena J, van Ijzendoorn GA et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res.* 2006; 72: 231-240.
17. Allen KL, Hamik A, Jain M, McCrae KR. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies is modulated by Krüppel-like transcription factors. *Blood.* 2011; 117: 6383-6391.
18. Le NT, Takei Y, Izawa-Ishizawa Y, Heo KS, Lee H et al. Identification of activators of ERK-5 by high-throughput screening and the role of endothelial ERK-5 in vasoprotective effects induced by statins and antimalarial agents. *J Immunol.* 2014; 193: 3803-3815.
19. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 89: 122-135.
20. Seals DR, Kaplon RE, Gioscia-Ryan RA, LaRocca TJ. You're only as old as your arteries: Translational strategies for preserving vascular endothelial function with aging. *Physiology (Bethesda).* 2014; 29: 250-264.
21. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging. *Clin Sci.* 2015; 128: 69-79.
22. Spronk HMH, Borisoff JI, ten Cate H. New insights into modulation of thrombin formation. *Curr Atheroscler Rep.* 2013; 15: 363.
23. Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Manhalter Ch, Jilma B. Thrombin as a multifunctional enzyme. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 1020-1033.
24. Huntington JA. Thrombin inhibition by serpins J *Thromb Haemost.* 2013; 11 (Suppl 1): 254-264.
25. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013; 93: 327-358.
26. Mohan Rao LV, Esmon ChT, Pendurini UR. Endothelial cell protein C receptor: a multi-liganded and multifunctional receptor. *Blood.* 2014; 124: 1553-1562.
27. Mahajan-Takur Sh, Böhm A, Jedlitschky G, Schrör K, Rauch BH. Sphingosine-1- Phosphate and his receptors: a mutual link between coagulation and inflammation. *Mediators of inflammation.* 2015; Article ID 831059.
28. Al Dieri R, de Laat B, Hemker C. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev.* 2012; 197-203.
29. Coughlin Sh R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407: 258-264.
30. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost.* 2015; 113:1224-1235.
31. Henke PK, Wakefield T. Thrombus resolution and vein wall injury: dependence on chemokines and leukocytes. *Thromb Res.* 2009; 123 (Suppl 4); S72-S78.
32. Byrnes JC, Duval C, Wang Y et al. Factor XI-IIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin a-chain crosslinking. *Blood.* 2015; 126: 1940-1948.
33. Du VX, Huskens D, Maas C, Al Dieri R, de Groot PG et al. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40:72-80.
34. Kaibara M, Iwata H, Ujiie H, Himeno R, Kaibara M. Rheological analyses of coagulation of blood from different individuals with special reference to procoagulant activity of erythrocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005; 16(5): 355-363.
35. Vallés J, Santos MT, Aznar J. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and Pselectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood.* 2002; 99 : 3978-3984.

36. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami Ch, Hayes V, Masefski W et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 2014; 123: 1596-1603.
37. Springer TA. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*. 2014; 124: 1412-1425.
38. Zeong XL. Dnase, ADAMTS 13, and iPAD4:- good for the heart. *Blood*. 2014;123:10-11.
39. Mc Fadyen JD, Jackson SP. Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit. *Thromb Haemost*. 2013; 110: 859-867.
40. Colman RW. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med*. 2006; 203: 493-495.
41. Renne T, Schmaier AH, Nickel KF, Blomback M, Maas C. In vivo roles of Factor XII. *Blood*. 2012;120: 4296-4303.
42. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Fuchs TA et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2032-2040.
43. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66.155 cases and 91.307 controls. *Lancet*. 2006; 367 (9511): 651-8.
44. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, White MJ, Yao Y et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*. 2009; 114: 663-666.
45. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and prothrombotic phenotype. *Nature Med*. 2007;13:1086-1095.
46. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014; 276: 618-632.
47. Geddings JE, Nackman N. Tumor-derived tissue factor positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*. 2013; 122: 1873-1880.
48. Schulz C, Engelmann B, Massberg S. Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2013; 11 (Suppl 1): 233-241.
49. Morange PE, Tregouet DA. Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2013; 11 (Suppl1): 111-121.
50. Fuchs TA, Brill A, Wagner D. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 August; 32: 1777-1783.
51. Ramacciotti E, Myers Jr DD, Wroblewski SK, Deatrick B, Londy F. P-selectin/PSGL-1 inhibitors versus enoxaparin in the resolution of venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Res*. 2010; 125: e138-e142.
52. Turpie AGG, Esmon Ch. Venous and arterial thrombosis - pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost*. 2011; 105: 586-596.