

# Inhibidores fisiológicos

## Physiological inhibitors

Forastiero R

*Departamento de Fisiología, Universidad Favaloro,  
Fundación Favaloro, Buenos Aires, Argentina*

rforastiero@favaloro.edu.ar



ARTÍCULO  
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA  
Volumen 21 N° Extraordinario: 43-47  
Fisiología de la hemostasia normal  
Agosto 2017

**Palabras claves:** hemostasia,  
inhibidores fisiológicos,  
trombosis.

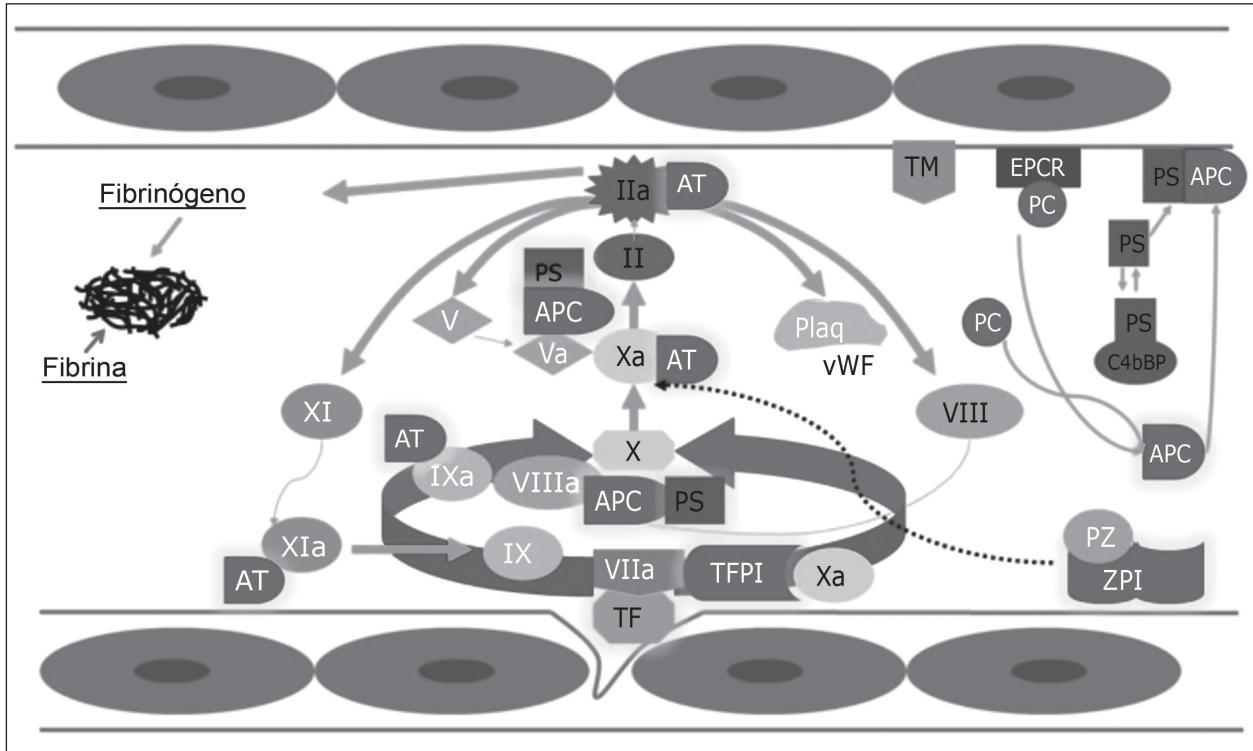
**Keywords:** hemostasis,  
physiological inhibitors,  
thrombosis

La hemostasia es un proceso que incluye una serie de reacciones proteolíticas que secuencialmente genera una gran variedad de enzimas. La localización y la limitación del proceso hemostático a los sitios de daño vasculares es la principal característica del sistema hemostático. La actividad de las mismas debe ser limitada al sitio de la injuria para detener la propagación de sus efectos en la circulación. Esto es llevado a cabo por una serie de mecanismos endógenos de control. Existe una familia de proteínas plasmáticas con capacidad para inhibir las enzimas/proteasas o inactivar a los llamados cofactores de la coagulación. Cuando existen deficiencias congénitas o adquiridas de estos inhibidores fisiológicos hay claramente una tendencia trombótica.

Los inhibidores fisiológicos se clasifican en serpinas

o inhibidores de serinoproteasas, otros inhibidores que no son exclusivamente antiserinoproteasas sino antiproteasas en general y algunos que inactivan a los cofactores proteicos. Las serpinas forman in vivo un complejo 1:1 con la serinoproteasa neutralizando el sitio activo de la enzima, y de esa manera inducen una depuración acelerada del complejo circulante. Por este motivo a las serpinas se las denomina proteínas suicidas. La familia de las serpinas representa el 10 % de las proteínas plasmáticas.

Existen 4 sistemas anticoagulantes naturales: el sistema antitrombina, el sistema de la proteína C, el inhibidor de la vía extrínseca (TFPI), y el inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI). La **figura 1** ilustra los sitios de acción de los principales inhibidores fisiológicos.

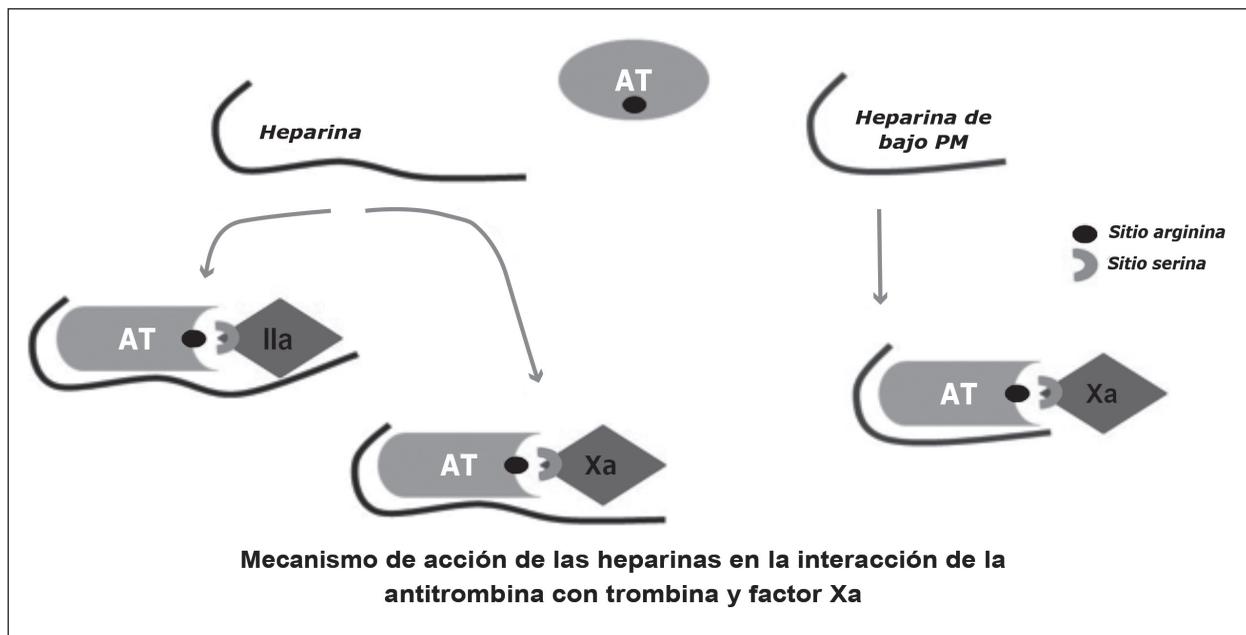


**Figura 1.** Sitios de acción de los distintos inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación

### Sistema antitrombina

La antitrombina (AT) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las serpinas. Tiene un peso molecular (PM) de 58 KD y es de cadena simple. Es de síntesis hepática y su vida media es de 2,5 días. Neutraliza las proteasas de la coagulación (trombina, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa) formando complejos con los factores activos. La heparina acelera la inactivación de las proteasas en aproximadamente 500-1000 veces. Aproximadamente el 30% de las cadenas de heparina presentan el pentasacárido de carga negativa que es la región responsable de la unión AT-heparina. La heparina y el heparán sulfato son polímeros heterogéneos de ácido idurónico y glucosamina sustituido con grupos N-sulfatos y O-sulfatos. En la sangre no existe heparina circulante, pero el endotelio vascular es rico en proteoglicanos con cadenas laterales de heparina/heparán que son necesarias para el reconocimiento por la AT. La heparina induce un cambio conformacional en la AT que resulta en una mejor exposición del sitio activo de la AT para interactuar con la enzima. Neutraliza las proteasas de la coagulación a través de la interacción de un sitio reactivo (arginina) en la AT y un

centro activo (serina) en la enzima. La interacción AT-trombina se la conoce como mecanismo puente porque la heparina a través de sus cargas negativas reacciona con las cargas positivas de la AT. Por otro lado la trombina, a través de su región *anion binding exosite II*, interacciona con las cargas negativas de la heparina. De este modo se produce un acercamiento de los 3 componentes (AT, trombina, heparina) que favorece la inhibición de la trombina por la AT. En cambio, la neutralización del factor Xa por parte de la heparina se lleva a cabo por un mecanismo alostérico en donde la heparina está unida a la AT, pero no interactúa con el factor Xa. La heparina de bajo PM (HBPM) tiene cadenas más cortas y sólo tiene capacidad de acelerar la reacción AT-factor Xa porque no necesita unirse a la enzima. En cambio, la trombina necesita unirse a las cadenas de heparina para interactuar eficientemente con la AT. Por este motivo la HBPM inactiva sólo al factor Xa y la heparina convencional tiene capacidad de inactivar ambas enzimas (trombina y factor Xa). El sistema AT-heparina es el mecanismo principal de neutralización de los factores activados y se ilustra en la **figura 2**.



**Figura 2.** Mecanismo de acción de las heparinas en la interacción de la antitrombina con trombina y factor Xa.

Las deficiencias congénitas de AT se asocian al riesgo trombótico. También se pueden presentar deficiencias adquiridas en el caso de hepatopatías (defecto de síntesis), síndrome nefrótico (por pérdida urinaria) o por consumo en diversas situaciones clínicas como sepsis, coagulación intravascular diseminada, etc.

### Sistema de la proteína C

El sistema proteína C inhibe dos cofactores: el factor Va y el factor VIIIa. Este sistema está constituido por la proteína C, la proteína S y la trombomodulina.

**TROMBOMODULINA (TM).** Es una glicoproteína transmembrana que une específicamente trombina y actúa como cofactor para la activación de la proteína C por trombina. Para que la proteína C cumpla su función anticoagulante debe ser activada (APC) sobre la superficie de las células endoteliales, donde se forma un complejo reversible de alta afinidad entre la trombina y la trombomodulina. Este complejo activa catalíticamente a la proteína C, la cual se disocia rápidamente de este complejo.

**PROTEÍNA S.** Es la única proteína dependiente de vitamina K que no es una enzima, sino que es un cofactor de la proteína C activada. Es sintetizada en el hígado y la vida media es de 60 horas. Es una proteína de cadena única en la que se distinguen 4 dominios: (a) dominio Gla que contiene 12 residuos

de ácido carboxiglutámico, (b) una región sensible a la trombina, (c) cuatro dominios tipo factor de crecimiento epidérmico y (d) una región carboxilo-terminal distinta a otros factores vitamina K dependiente. Participa en la interacción con la C4bBP (proteína de unión de C4b). La proteína S favorece la interacción de la proteína C con los cofactores porque produce un acercamiento de la APC a los fosfolípidos de las membranas y de esa manera acerca a la APC a los sitios de clivaje ubicados en los cofactores. En el plasma la proteína S circula en dos formas, 40% en forma libre (funcional) y 60% unida a la C4bBP.

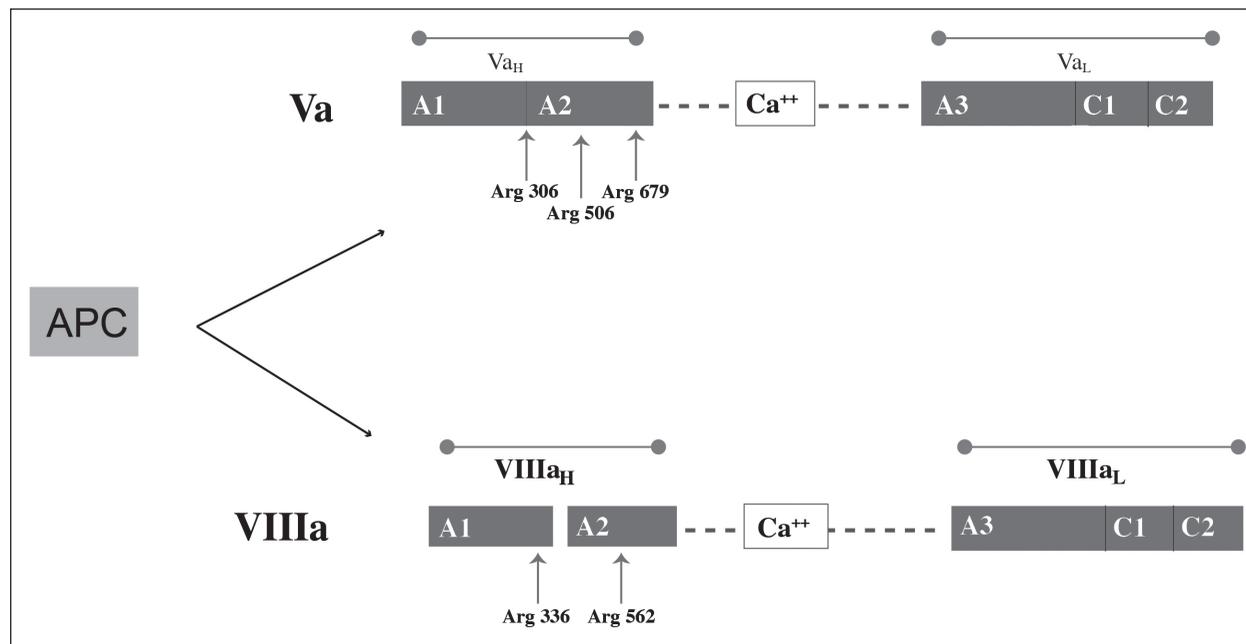
**PROTEÍNA C.** Es una glicoproteína dependiente de vitamina K que circula en el plasma como precursor de serino proteasa. Es sintetizada en el hígado y secretada como un polímero de 2 cadenas unidas por puente disulfuro. La vida media es corta, de 4-6 horas. Las proteínas de este sistema anticoagulante natural (proteína C, proteína S y trombomodulina) tienen 3 regiones comunes: (a) dominios Gla donde se encuentran los dominios  $\gamma$  carboxiglutámicos necesarios para la interacción con la membrana celular, (b) región homóloga al factor de crecimiento epidérmico, y (c) región del sitio activo que posee 65% de homología a la quimotripsina.

El receptor de proteína C es una proteína transmembrana expresada en las células endoteliales (EPCR). Une la proteína C a través de los dominios Gla y

contribuye a la activación de la proteína y al anclaje de la proteína C a la superficie endotelial.

La proteína C se activa a APC por acción de la trombina que está unida a la trombosmodulina de la superficie endotelial. La APC en presencia de proteína

S y factor V inactiva a los cofactores Va y VIIIa. La inactivación se produce por el clivaje de la APS en 2 sitios del factor VIIIa (argininas 336 y 562) y en 3 sitios del factor Va (argininas en posiciones 306, 506 y 679), como se ilustra en la **figura 3**.



**Figura 3.** Acción de la proteína C sobre FVa y FVIIIa.

Las deficiencias congénitas de proteínas C y S se asocian al riesgo trombótico. También se pueden presentar deficiencias adquiridas, principalmente en el caso de hepatopatías o tratamientos con anticoagulantes orales tipo warfarina (defecto de síntesis), o por consumo en diversas situaciones clínicas como sepsis, coagulación intravascular diseminada, etc. La proteína S además disminuye en mujeres bajo tratamientos de reemplazo hormonal, anticonceptivos orales y, fisiológicamente, durante el embarazo.

### Inhibidor de la vía extrínseca

La regulación del complejo macromolecular, factor VII-factor tisular (FT), está mediado por el inhibidor de la vía extrínseca (TFPI). Es una molécula cargada negativamente en su extremo amino-terminal, seguida por tres dominios inhibitorios tipo Kunitz y un extremo carboxilo-terminal cargado positivamente. El complejo factor VII-FT puede ser inhibido sólo después que se ha iniciado el proceso de la coagulación. La reacción de inhibición requiere la presencia del factor Xa, que es el producto directo de la reacción del FVII-FT sobre sus sustratos. El

TFPI no es miembro de las serpinas sino que pertenece a un grupo de inhibidores de serino proteasas tipo Kunitz. Las células endoteliales son su fuente principal. Las plaquetas contienen el 10% del TFPI de la sangre y es secretado durante la activación plaquetaria.

El dominio Kunitz 1 es el que interacciona con el complejo factor VIIa-FT, el 2 con el factor Xa y el 3 está involucrado en la interacción del TFPI con las lipoproteínas. Cerca del carboxilo terminal posee una región de aminoácidos básicos por la cual se une a la heparina y cuya presencia facilita la inhibición del factor Xa.

Tiene una vida media de 60-120 minutos. El PM es entre 35-44 KD y esta heterogeneidad se debe a que en plasma existen el TPFI nativo, la forma unida a lipoproteínas y un TFPI truncado en su estructura. Existen dos isoformas del TFPI: el TFPI-a y el TFPI-b. El 80% del TFPI circula unido a lipoproteínas (LDL 55%, HDL 20-25% y VLDL 5-10%) y el resto en forma libre. Las heparinas liberan TFPI endotelial.

El TFPI puede unirse al FXa e inhibir su función enzimática en una reacción que requiere el dominio

Gla del FXa. Sin embargo, el dominio Gla y el calcio son necesarios para la inhibición del FVIIa-FT por el TFPI. La inhibición ocurre en 2 etapas: (a) el TFPI por el Kunitz 2 se une al FXa en presencia de calcio en una reacción que requiere el sitio activo del FXa, y (b) el complejo TFPI-FXa se une al FVIIa-FT a través del Kunitz 1 por un mecanismo que necesita FVIIa en su conformación dependiente de calcio. En este paso el complejo TFPI-FXa actúa uniéndose al factor VIIa-FT en una conformación que permite que un segundo dominio inhibitorio del TFPI interactúe con el FVIIa. El resultado final es la formación de un complejo cuaternario inactivo que se depura como tal.

### **Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z**

La proteína Z (PZ) es un factor vitamina K dependiente. Tiene un PM de 62 KD y es de cadena simple. Su síntesis es hepática y la vida media es de 2,5 días. Su estructura molecular es muy similar a los factores VII, IX, X y proteína C, pero en contraste a éstos, la típica tríada de activación (histidina, serina, ácido aspártico) está ausente, por lo tanto, la PZ no tiene función proteolítica. En su extremo amino-terminal posee un dominio rico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico que le sirve a la proteína para interactuar con las membranas celulares en presencia de calcio, que al mismo tiempo sirve como cofactor para la inhibición del factor Xa por el inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI). Como otros factores vitamina K dependientes, los niveles de PZ son menores en pacientes con tratamiento cumarínico y en recién nacidos. La actividad procoagulante del factor Xa es inhibida en presencia de PZ. Esta inhibición es mediada por otra proteína, el ZPI que circula en el plasma formando complejos con PZ. Ambas son sintetizadas mayoritariamente en el hígado. El ZPI es una glicoproteína de cadena única que pertenece a la superfamilia de las serpinas, inhibidoras de serino proteasas. El ZPI tiene un PM de 72 KD. El ZPI, en presencia de PZ y de calcio iónico, inhibe rápidamente el factor Xa sobre superficies celulares en presencia de calcio. La acción del ZPI es incrementada en más de 1000 veces por el cofactor PZ. Para esto se han descrito dos vías: (a) la PZ y el factor Xa formarían un complejo en la superficie fosfolipídica que luego sería reconocido por ZPI, y (b) la PZ y ZPI formarían un complejo en circulación que luego se uniría al factor Xa adosado a la superficie fosfo-

lipídica. El resultado final de cualquiera de las dos vías es la formación de un complejo dependiente de calcio que contiene PZ, factor Xa y ZPI. La inhibición por parte del sistema ZPI se produce antes de la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). El factor XIa es inactivado por ZPI en una reacción que no requiere la presencia de PZ, fosfolípidos o calcio, y además no es afectada por la presencia de heparina. El rango normal de PZ es muy amplio y niveles descendidos se observan en los recién nacidos, pacientes con hepatopatías, coagulación intravascular diseminada y en aquéllos bajo tratamiento con dicumarínicos. Niveles incrementados de PZ se observan en mujeres durante el embarazo o ingesta de anticonceptivos.

### **Bibliografía**

1. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 102-15.
2. Lijfering W, Rosendaal F, Cannegieter S. Risk factors for venous thrombosis – current understanding from an epidemiological point of view. *Br J Haematol.* 2010; 149: 824-33.
3. Foerster J, Lukins J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. Endothelium and the regulation of hemostasis. *Wintrob's Clinical Hematology.* Vol I, décima edición, cap. 25: 1998, pp. 765-71.
4. Baglin T, Gray E, Greaves M et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol.* 2010; 149: 209-20.
5. Huntington JA. Natural inhibitors of thrombin. *Thromb Haemost.* 2014; 111:583-9.