



EFFECTO DEL PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA C EN LA HEMOSTASIA *IN VIVO*.

Hernández Jerónimo JM, Pérez Campos E, Majluf Cruz A.

Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Carretera a San Felipe del Agua s/n. Ex Hda. De Aguilera, Oaxaca. México. CP: 68020 Tel: (951) 5473124, (951) 5139784, fax: (951) 5131940.

RESUMEN

*El sistema de la proteína C (PC) es uno de los sistemas anticoagulantes naturales más importantes, que al ser activado actúa en dos sitios clave de la fase fluida de la coagulación bloqueando los factores V y VIII. Cuando la PC se activa (PCa), libera un péptido de 12 aminoácidos: El péptido de activación de la proteína C (pap C). El objetivo de nuestro estudio es utilizar el pap C buscando un efecto anticoagulante en un modelo *in vivo* (ratones Balb C). Se utilizaron trombina ó epinefrina como inductores de trombosis y albúmina como control, los efectos inducidos fueron evaluados mediante la determinación de Tiempo de Protrombina (TP), Tiempo parcial de Tromboplastina (TTP) y Tiempo de Trombina (TT). Los resultados en los ratones en los que se utilizó trombina fueron: alargamiento del TP y del TTP y acortamiento del TT, esto por consumo de factores de la coagulación e incremento de la trombosis, al administrar epinefrina no se observó modificación importante en los TC, y en los ratones a los que se les administró albúmina; no se observó modificación alguna de los TC (grupo control). En los ratones en los que se administró pap C más trombina, se observó un mayor alargamiento de los TC que el observado con trombina sola, en el grupo que se administró pap C más epinefrina se observó acortamiento no importante de los TC, pero al administrar pap C más albúmina ó pap C solo, se observó alargamiento del TT en forma similar en ambos grupos, el TP y el TTP no se modificaron, por lo que se infiere que el pap C tiene efecto anticoagulante sobre la vía común de la coagulación.*

INTRODUCCION

El sistema de la PC. En la hemostasia la generación de trombina está regulada por mecanismos de retroalimentación que inhiben a las cascadas de coagulación. El más importante es el sistema de la PC, -la que es activada por la trombina, que es capaz de actuar como procoagulante en la cascada de coagulación y también como anticoagulante, mediante un mecanismo descrito más adelante. El sistema de la PC, está compuesto por dos proteínas

dependientes de la vitamina K: la PC y la proteína S (PS). Ambas dependen para activarse de un receptor endotelial para la trombina (Tr), la trombomodulina (Tm). El complejo Tr-Tm, activa a la PC, la cual, una vez activada (PCa), se une a la PS en la superficie endotelial para inhibir a los factores Va y VIIIa (cofactores de los complejos protrombinasa y diezasa). Así, la PCa interrumpe dos pasos cruciales en la cascada de coagulación y la generación de trombina queda regulada por dos vías. Desde este punto de vista, el sistema de la PC es una respuesta anticoagulante esencial, necesaria para mantener la fluidez sanguínea. Fig. 1.

Al ser activada la proteína C, libera un péptido de 12 aminoácidos, denominado péptido de activación de la proteína C (pap C).

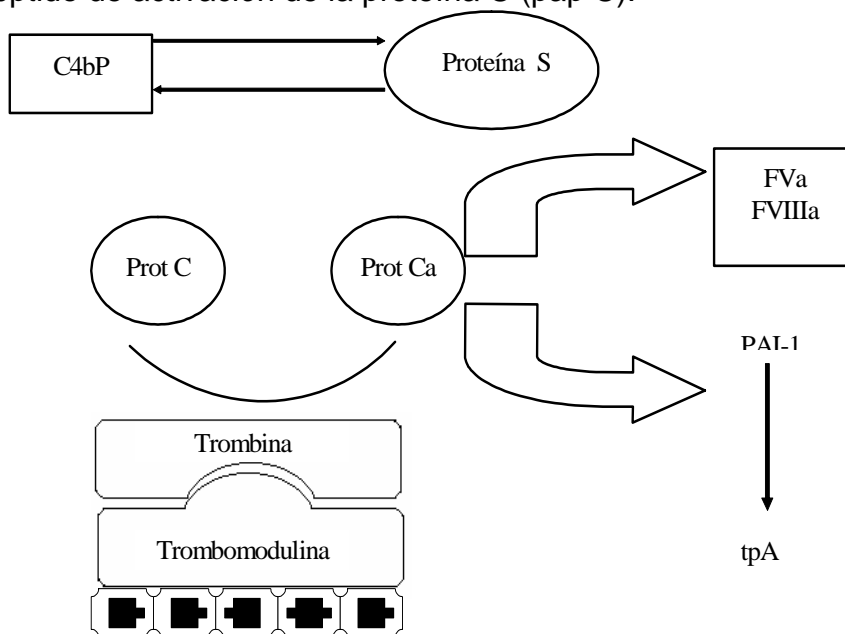


Fig. 1. Sistema de la PC.

El péptido de activación de la proteína C (pap C). Este péptido está formado por 12 aminoácidos: Asp-Thr-Glu-Asp-Gln-Glu-Asp-Gln-Val-Asp-Pro-Arg y se libera al ser activada la PC (Fig.2). Se ha demostrado *in vitro* que, en presencia de trombina, el pap C inhibe la agregación plaquetaria a dosis de 2 nM y esta inhibición es proporcional a la dosis de pap C (4,6). Estos estudios han reportado que pap C produce efecto inhibitorio sobre trombina; esto es por unión de pap-C en la membrana plaquetaria en el sitio de unión para trombina a través de receptores proteasa-activados, los receptores a (PAR1 y PAR 4).

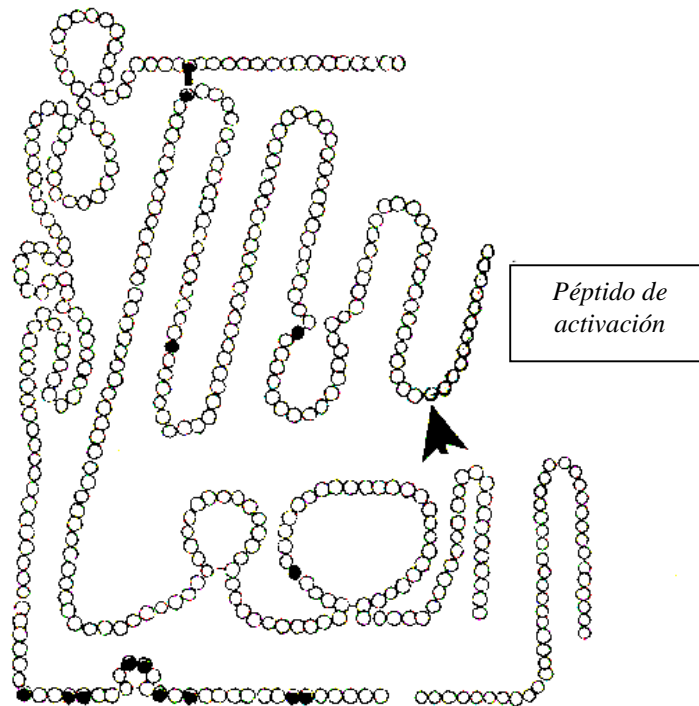


Fig. 2. Proteína C y péptido de activación de la PC.

PROBLEMA.

¿El pap C tendrá algún efecto en la hemostasia en un modelo *in vivo* (ratón) en la trombosis inducida con trombina?

OBJETIVO.

Demostrar que el pap C actúa en la fase fluida de la coagulación en un modelo *in vivo* de trombosis experimental.

MATERIAL Y METODOS: Se utilizaron ratones Balb C machos con un peso aproximado de 20 a 25 gr., en cada grupo se incluyeron 6 ratones. Se utilizó Trombina humana (Licon), pap C con 75% de pureza, adrenalina (Pisa), albúmina humana (Bioclon) y reactivos para determinación de TP, TTP y TT (Licon). Los medicamentos utilizados fueron administradas en las venas de la cola del ratón, en un volumen fijo de 0.1 ml. La dosis de trombina utilizada fue de 49, 100, 149 μ M, la de epinefrina fue 2.2, 5.5 y 11 nM, la de albúmina de

1,2,y 3 nM, la dosis de pap C utilizada fue de 1, 2 y 3 nM. El pap C administró previamente (3 minutos) a la de trombina o epinefrina según el caso, Posterior a la administración de los reactivos, después de un periodo de 5 minutos se efectuó la obtención de la sangre, para la determinación de Tiempo de Protrombina (TP), Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa) y Tiempo de Trombina (TT), mediante punción cardiaca, previa anestesia con vapores de cloroformo. La muestra obtenida fué anticoagulada con 100 µL de citrato de sodio al 3.2 % y centrifugada durante 10 min. a 1000 rpm, obtener el plasma escaso en plaquetas. La determinación de TP, TTP y TT se realizó con las técnicas ya conocidas. La duración de cada experimento fue de aproximadamente 15 minutos con el sacrificio final de los ratones para extracción de los pulmones y fijados en solución de formol al 10% para realización de estudio histopatológico.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS:

I. Inducción de tromboembolismo: Al primer grupo de seis ratones se inyectó trombina a dosis de 49, 100, 149 µM.

Al segundo grupo se le inyectó epinefrina a dosis 2.2, 5.5 y 11 nM. El tercer grupo fue el grupo control y se inyectó albúmina a dosis 1, 2 y 3 nM.

II. Empleo de pap C: En el cuarto grupo se utilizaron dosis de 1, 2, y 3 nM de pap C, posteriormente se administró a cada ratón trombina a dosis de 149 µM. En el quinto grupo se administró pap C a dosis de 1, 2,3 nM y epinefrina a dosis de 11 nM. En el último grupo (sexto) se administró únicamente pap C.

RESULTADOS:

La administración de trombina dio como resultado el alargamiento de los Tiempos de Protrombina y Tromboplastina parcial activada directamente proporcional a la cantidad de trombina a diferencia del Tiempo de trombina donde se observó una relación inversa a la cantidad de trombina administrada.

La epinefrina también incrementó el TP observándose una relación directa a la dosis de epinefrina, aunque en menor proporción que con trombina. En cuanto al TP y TT se observó una disminución de ambos con una relación inversa a la dosis de epinefrina.

En cuanto a la Albúmina no produjo modificación de los Tiempos de coagulación. Cuadro 1. Graficas 1-3 (Anexo).

CONTROL	TP:12.7''	TTP:26.9''	TT:48.10''
1. TROMBINA: µM	TP: seg.	TTP: seg.	TT: seg.
49	10.1	28.9	51.4
100	15	33.7	37.5
149	19.2	38.6	31
2.EPINEFRINA: nM	TP: seg.	TTP: seg.	TT: seg.
2.2	7.6	28.8	54
5.5	8.8	22.6	35.1
11	10.3	17	34.1
3. ALBUMINA: nM	TP: seg.	TTP: seg.	TT: seg.
1	13.4	29.3	33.7
2	12.8	24.5	35.3
3	14	28.6	32.2

Cuadro 1. Administración de trombina, epinefrina y albúmina *in vivo* evaluada con TP, TTP y TT.

La administración de pap C con trombina (4º Grupo), produjo mayor alargamiento del TP Y TTP observándose una relación directa a la cantidad de pap C administrada, en cuanto al TT también se prolongó y se observó una relación inversa a la dosis de pap C administrada.

La administración de pap C y epinefrina (5º grupo), produjo disminución del TP, TTP y TT observándose una relación inversa a la dosis de pap C administrada.

Al administrar al sexto y séptimo grupos pap C y albúmina y solo pap C respectivamente, no se observó modificación importante en el TP y TTP, pero si se observó alargamiento del TT en ambos grupos con resultados similares.

Cuadro 2. Gráficas 4-6 (Anexo).

--	--	--	--

CONTROL	TP:12.7"	TTP:26.9"	TT:48.10"
	TP: seg.	TP: seg.	TP: seg.
4. TROMBINA + pap C			
149 μ M + 1 nM	16.8	59.9	64.1
149 μ M + 2 nM	18.2	60.6	61.9
149 μ M + 3 nM	23.5	62.4	60.5
5. EPINEFRINA + pap C	TP: seg.	TP: seg.	TP: seg.
11 nM + 1 nM	9.9	27.3	37.6
11 nM + 2 nM	9.7	25.2	36
11 nM + 3 nM;	8.5	22.5	27.6
6. Albúmina + pap C	TP: seg.	TP: seg.	TP: seg.
1 nM + 1 nM	11.60	29.00	42.40
2 n M + 2 nM	8.70	26.70	50.40
3 nM + 3 nM	9.60	37.70	75.50
7. PapC	TP: seg	TTP: seg	TT: seg
1 nM	11.4	29	43.5
2 nM	11.9	25.2	54.1
3 nM	11.3	24.5	75.8

Cuadro 2. Administración de pap C con trombina, pap C con epinefrina, pap C con albúmina y pap C solo.

CONCLUSIONES:

- I. **Inducción de trombosis con trombina:** La administración de 49, 100, y 149 μ M de trombina humana produce aumento del Tiempo de Protrombina (TP) y Tromboplastina parcial activada (TTPa) y disminución del Tiempo de Trombina (TT). Esto puede explicarse por incremento en el consumo de factores de la coagulación disparados por la administración de trombina, con incremento de la formación de fibrina insoluble que se manifiesta como disminución del TT.
- II. **Efecto de la epinefrina sobre la fase fluida de la hemostasia.** La aplicación de epinefrina incrementa ligeramente el TP en una relación directa a la dosis de pap C y acorta el TTP y TT. Probablemente por acción principalmente en la primera fase de la hemostasia, (plaquetas), con efecto secundario en la segunda fase de la coagulación y finalmente incremento en la formación de fibrina.

- III. Efecto de la albúmina sobre la hemostasia.** La administración de albúmina no modifica los tiempos de coagulación, no afecta la hemostasia y es utilizado como control. Graficas 1-3 (anexo).
- IV. Efecto del pap C previo a la administración de trombina.** Al administrar pap C en dosis de 1, 2, y 3 nM y trombina a dosis de 149 μ M se obtiene alargamiento del TP, TTP con valores mayores que los obtenidos previamente al aplicar únicamente trombina, por efecto anticoagulante del pap C.
- V. Efecto del pap C previo a la administración de epinefrina.** Produce acortamiento de los tiempos de coagulación en una relación inversa a la dosis de pap C administrada, probablemente por mayor efecto en la primera fase de la coagulación.
- VI. Efecto del pap C previo a la administración de albúmina.** El TP y el TTP se mantuvieron sin cambios a diferencia del TT en el que se observó alargamiento, por efecto en la fase común de la coagulación.
- VII. Efecto del pap C administrado solo.** No se observa modificación en el TP y TTP, pero si alargamiento del TT en relación directa con la dosis administrada de pap C, similar a los resultados obtenidos en el experimento previo. De lo que se infiere que el pap C tiene efecto en la vía común de la coagulación. Graficas 4-6 (anexo).

DISCUSIÓN

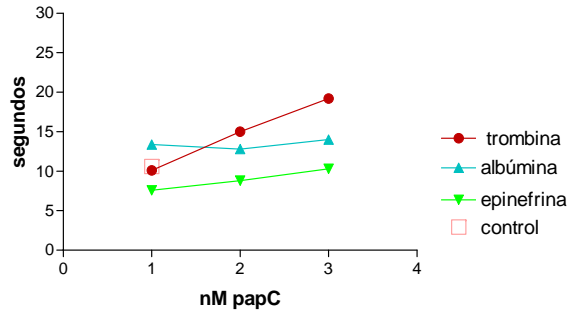
Los resultados obtenidos demuestran un efecto inhibitorio de pap C sobre la activación en la fase fluida de la coagulación inducida por trombina, demostrados por el alargamiento en los tiempos de Protrombina, de Tromboplastina Tisular activada y de trombina, además del efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria sobre plaquetas demostrado en estudio previo(4,6). Sin embargo al administrar pap C con albúmina ó únicamente pap C no se observa modificación importante sobre el TP Y TTP, pero si alargamiento del TT de lo que se infiere efecto del pap C ocurre a nivel de la vía común de la coagulación.

BIBLIOGRAFIA:

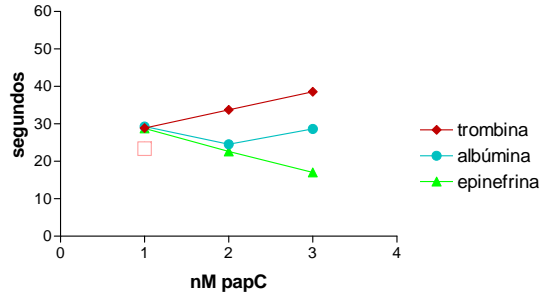
1. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30:10363-10370.
2. Majluf-Cruz A, De la Cadena R. El sistema de contacto: su papel en la hemostasia y su relación con otros sistemas biológicos. En Martínez-Murillo C, Quintana González S. *Manual de hemostasia y trombosis*. Editorial Prado, 1996; 49-64.
3. Majluf-Cruz A. Mecanismos hemostáticos. En Ruiz-Argüelles GJ. *Fundamentos de Hematología*. Editorial Panamericana 3a. Ed. 2003; 342-76
4. Pina CMS, López MJ, Martínez CR, Pérez-Campos E. Efecto del péptido de activación de la proteína C sobre la agregación plaquetaria. *Revista de Hematología*. XLV Congreso Anual de la Agrupación Mexicana para el estudio de la Hematología, A.C. mayo. 2004.
5. Gressele P, Momi S, Berretini, Nancy GG, Schwars, Semeraro N, Colucci M. Activated human protein C prevents thrombin-induced Thromboembolism in mice. *J Clin Invest* 1998; 101:667-676
6. Pina CS, Pérez-Campos E. Tesis de licenciatura. Efecto del péptido de la proteína C en la actividad plaquetaria. 2003
7. Momi S, Nasimi M, Colucci M, Nenci GG, Gressele P. Low molecular weight heparins prevent trombin-induced thromboembolism in mice despite low antithrombin activity. Evidence that the inhibition of feed-back activation of thrombin generation confers safety advantages over direct thrombin inhibition. *Haematol* 2001;86:297-302.
8. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987;235:1348-1353
9. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124:26S-32S
10. McKenzie SB. Métodos de laboratorio para el estudio de la coagulación. En *Hematología clínica* Editorial Manual Moderno.1996; 753-68.

ANEXO.

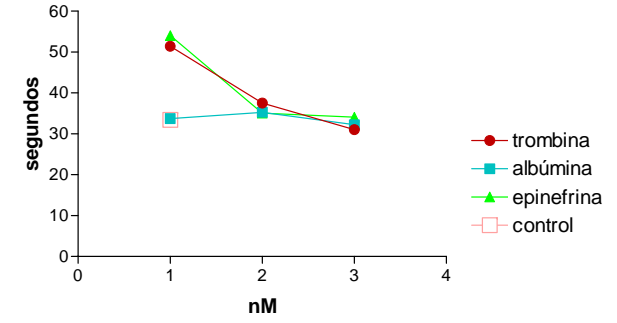
Grafica 1: Tiempo de protrombina en ratones Balb C



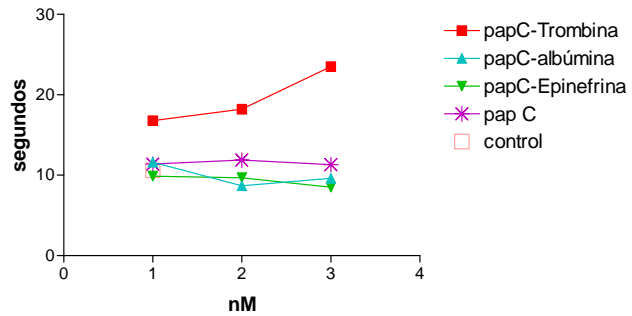
Grafica 2: TPT en ratones Balb C



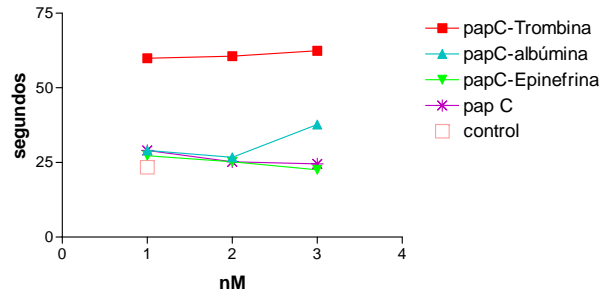
Grafica 3: Tiempo de Trombina en ratones balb C



Grafica 4: Tiempo de Protrombina en ratones Balb C



Grafica 5: TTP en ratones Balb C



Grafica 6: Tiempo de Trombina en ratones Balb C

