

El papel de la vía de la proteína C en la inflamación: implicaciones terapéuticas

V. ARQUEROS, F. VELASCO

Servicio de Hematología. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC).
Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

Introducción

En los años 70, el conocimiento sobre los mecanismos que regulaban la coagulación se amplió a raíz del descubrimiento de una nueva vía anticoagulante que tenía como principal componente a una proteína vitamina K-dependiente denominada *proteína C*⁽¹⁾. Desde entonces, el sistema anticoagulante de la proteína C (SAPC) está íntimamente vinculado a la aparición de fenómenos trombóticos. Sin embargo, más tarde, se ha demostrado que este sistema no sólo tiene una función anticoagulante, sino que además participa activamente en los procesos antiinflamatorios y antiapoptóticos.

A continuación revisaremos estas propiedades del SAPC y las posibilidades que brindan en el tratamiento del déficit congénito de sus componentes y en la respuesta inflamatoria.

Sistema anticoagulante de la proteína C

Propiedades biológicas de la proteína C

La proteína C es una proteasa que se sintetiza principalmente a nivel hepático, aunque se han identificado otros lugares de síntesis como el riñón, el pulmón o el cerebro. Contiene 419 aminoácidos, y el gen humano que la codifica (PROC) se encuentra en el cromosoma 2 (2p13-14). Las modificaciones co-traduccionales y post-traduccionales incluyen la β -hidroxilación, la N-glicosilación y la γ -carboxilación de sus 9 residuos de ácido glutámico dando lugar a 9 residuos Gla en el extremo amino terminal (el dominio "Gla"); este último es fundamental para su acción anticoagulante. El dominio Gla, en presencia del Ca^{++} , interactúa con los fosfolípidos cargados negativamente de la superficie celular, siendo el lugar clave para la interacción de la proteína C con su receptor endotelial (EPCR) (Figura 1).

La conversión de la proteína C (PC) a forma activada (PCa) resulta de la escisión del enlace peptídico Arg169-Leu170, que libera un dodecapéptido (residuos 158-169) de la cadena pesada. Esta reacción se ve facilitada por la trombina (T) unida a la trombo-modulina (TM) y es intensificada gracias a la interacción de la PC con el EPCR en la superficie celular⁽²⁾. Esta activación también puede producirse en ausencia del receptor, pero en un rango menos eficiente y probablemente poco relevante.

La función de la PCa como anticoagulante se manifiesta por su capacidad para inactivar dos cofactores importantes de la cascada de la coagulación, el factor V/Va (FV/Va) y el FVIII/FVIIIa. Estas acciones son potenciadas por la presencia de Ca^{++} , fosfolípidos y otra vitamina K-dependiente, la proteína S.

Mecanismo de acción de la proteína C

La vía de la proteína C consta de múltiples proteínas que, como ya hemos mencionado, participan en diferentes puntos: las que afectan a su activación, las

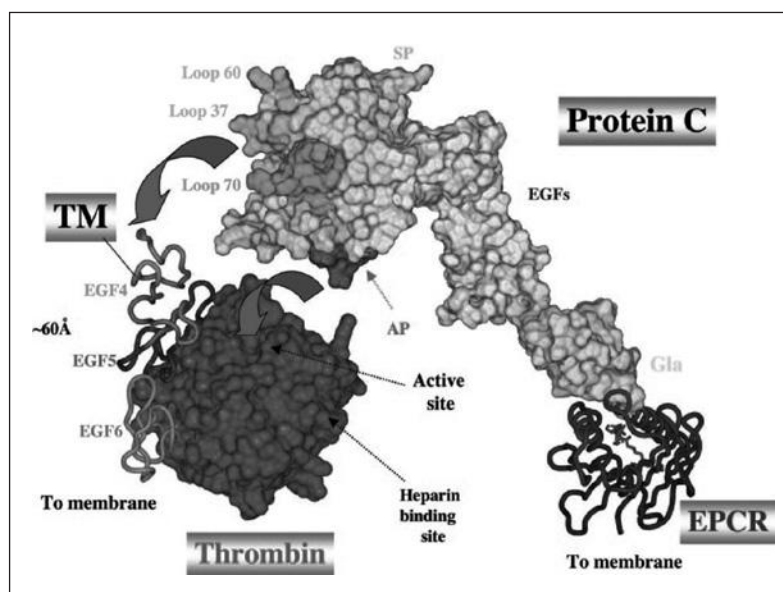


Figura 1. Vista general del complejo proteína EPCR-proteína C-TM (tomada de Björn Dahlbäck y col. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005).

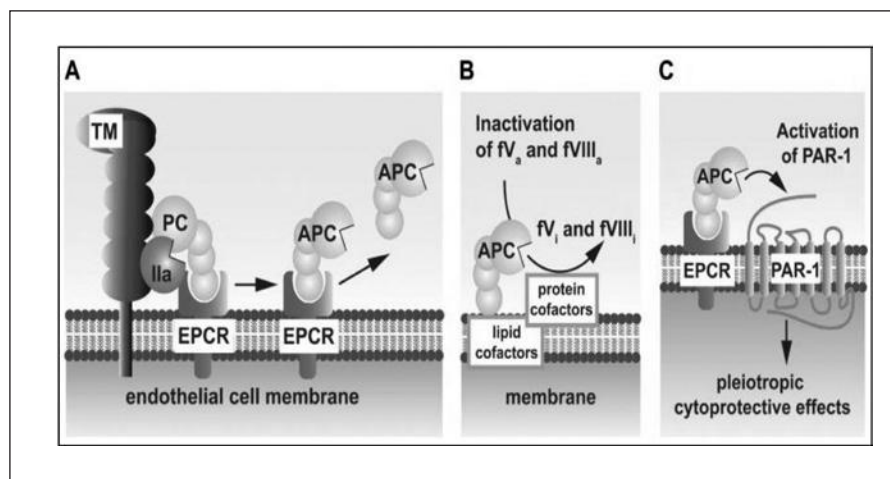


Figura 2. Modelo de activación y acciones de la proteína C activada. (A) Activación de la proteína C. (B) Acción anticoagulante de la PCa. (C) Acción citoprotectora de la PCa (tomada de L. Mosnier y col. Blood 2007).

que inhiben su actividad y las que modulan la actividad proteolítica.

La activación de la proteína C es catalizada eficientemente en la superficie de las células endoteliales por la unión T-TM. La trombomodulina funciona como un cofactor de alta afinidad de la trombina, y el resultado de esta unión es el aumento de la tasa de activación de la proteína C en 1.000 veces. Una activación que, como se subrayó anteriormente, se ve favorecida cuando la PC está ligada a su receptor.

La actividad anticoagulante de la PCa está reforzada por dos cofactores, la proteína S y la forma intacta del FV. La proteína S es suficiente para la inactivación del FVa, mientras que la regulación del FVIIIa requiere la acción sinérgica entre la PCa, y la proteína S y el FV⁽³⁾.

La proteína S no es sólo un componente importante de esta vía, sino que también toma partido en la regulación del sistema del complemento, ya que forma un complejo de alta afinidad con la proteína de unión C4b, un regulador de la vía clásica. En el torrente sanguíneo, entre el 30 y el 40% de la proteína S circula como forma libre y es ésta la que tiene capacidad de actuar como cofactor en el SAPC, mientras que el resto está unido a la proteína C4b.

Aunque los inhibidores de proteasa como el inhibidor de la proteína C, la α 1-antitripsina y la α 2-macroglobulina inhiben la PCa, su vida media en la circulación es relativamente larga (\approx 20 minutos)⁽⁴⁾.

Otras funciones de la PCa en la hemostasia están en consonancia con mantener la sangre en estado líquido. Así, también participa en la regulación del sistema fibrinolítico, una función que es mediada por su capacidad para inhibir tanto al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) como al inhibidor de la fibrinólisis mediado por la trombina⁽⁵⁾ (TAFI).

Todas estas reacciones biológicas se producen en las superficies celulares e incluyen la activación de la PC, la expresión de su actividad anticoagulante y el inicio de sus acciones citoprotectoras, como veremos más adelante (Figura 2).

Anomalías del SAPC: complicaciones trombóticas

El sistema de la proteína C es de vital importancia para mantener fluida la circulación sanguínea. Sus anomalías, por tanto,

se traducen en complicaciones trombóticas. Así, se han descrito déficits heredados y adquiridos, individuales y compuestos, y homocigotos o heterocigotos en los seres humanos, producidos en diferentes loci de la proteína.

La prevalencia del déficit alélico en la población es de aproximadamente 1/600, y las deficiencias heterocigóticas, de 1/300; por consiguiente, la deficiencia total se produce en alrededor de 1/200.000-300.000 recién nacidos.

Las deficiencias homocigotas, aunque poco frecuentes, cuando aparecen en el neonato cursan con trombosis intravascular diseminada fatal, junto con su análogo cutáneo, la *Purpura fulminans*⁽⁶⁾, una complicación que requiere tratamiento con preparados comerciales de PC.

El déficit heterocigoto sintomático puede dar lugar a trombosis venosa profunda y embolia pulmonar, y se produce de forma espontánea o después de la exposición a eventos de riesgo, como cirugía o traumatismos, un riesgo que es similar al déficit de proteína S, y juntos representan, al menos, la causa de trombosis venosa en un 5-10% de los pacientes.

Propiedades citoprotectoras de la proteína C

Mecanismo antiinflamatorio/antiapoptótico

Hasta hace poco, los investigadores suponían que la actividad sistémica anticoagulante de la PCa mediaba en los efectos beneficiosos antiinflamatorios, ya que infrarregula la generación de trombina, reconocida por sus propiedades proinflamatorias. Sin embar-

go, los hallazgos de laboratorio y los datos de ensayos clínicos han cambiado este punto de vista.

Estudios amplios *in vivo* e *in vitro* en relación con accidentes isquémicos cerebrovasculares en modelos murinos han indicado que los efectos neuroprotectores de la PCa, parcialmente, son independientes de su acción anticoagulante. Asimismo, otros estudios recientes han mostrado que las variantes obtenidas en el laboratorio con una actividad anticoagulante muy reducida previenen la muerte inducida por endotoxemia en ratones. Estas observaciones apoyan la idea de que los efectos beneficiosos citoprotectores de la PCa son eficaces *in vivo* y que son, al menos en parte, independientes de su actividad anticoagulante.

En este sentido, se ha demostrado que muchos de estos efectos dependen de la presencia simultánea del EPCR y del receptor-1 activado por proteasa (PAR-1) en la membrana celular. Este último, después de su activación por la PCa, desencadena la señalización intracelular de las acciones citoprotectoras^(7,8).

Estos efectos se dividen en: a) alteración de los perfiles de expresión génica; b) actividad antiinflamatoria; c) actividad antiapoptótica y d) estabilización de la barrera endotelial^(9,10). Aunque potencialmente todos ellos se encuentran relacionados entre sí, cada una de estas acciones es distinta y puede o no involucrar a los mismos mecanismos intracelulares con un efecto dosis-respuesta determinado en función del perfil del receptor celular, su ubicación y las propiedades específicas de la célula.

a) Modificación en el perfil de expresión génica

Las alteraciones en los perfiles de transcripción génica causados por el tratamiento con PCa sobre las células revelaron la modulación en la expresión de los genes de las principales vías de la inflamación y la apoptosis⁽¹¹⁾. Estos efectos suponen, en general, la infrarregulación de las vías proinflamatorias y proapoptóticas y la sobreexpresión de las vías antiinflamatorias y antiapoptóticas.

En esta línea, se ha demostrado que la PCa suprime el factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) mediante la modulación de genes que directamente reducen su expresión y su actividad funcional, provocando la inhibición de la señalización de citoquinas y la inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF). Asimismo, la PCa hace que se sobreexpresen los productos relacionados con el gen antiapoptótico Bcl-2 y suprime la expresión de los genes proapoptóticos p53 y Bax.

Por otra parte, la PCa también suprime los factores de transcripción, activados por la inflamación, de la familia de la proteína activadora-1 (AP-1) c-Fos y FosB, que inducen directamente a la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y a la proteína qui-

miotáctica-1 de monocitos (MCP-1) en las células endoteliales.

Sin embargo, hemos de subrayar que todos estos mecanismos moleculares sobre la expresión génica aún no se han aclarado totalmente. No obstante, se piensa que parte de la modulación de estos perfiles está mediada por la participación e interacción de los dos receptores anteriormente mencionados: el EPCR y el PAR-1. Este último puede ser activado por la PCa y la trombina en las células endoteliales, siendo sus efectos sobre la alteración en los modelos de transcripción diferentes⁽¹²⁾.

b) Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria vascular de la PCa se divide en sus efectos sobre las células endoteliales y los leucocitos.

En las células endoteliales inhibe la liberación de los mediadores inflamatorios y regula las moléculas de adhesión vascular (tales como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina), limitando así la adhesión leucocitaria y la infiltración.

Sobre los leucocitos, la PCa disminuye la liberación de citoquinas. De esta forma, atenúa el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica y reduce la llamada "tormenta de citoquinas" que se asocia con la sepsis.

No obstante, los mecanismos que regulan estos efectos antiinflamatorios sobre los leucocitos no están del todo claros; sin embargo, la evidencia indica que el EPCR y el PAR-1, solos o conjuntamente (Figura 3A), al igual que ocurre con las alteraciones en la expresión génica, juegan un importante papel, unas interacciones en las que también participan la proteína 3 y el complejo integrina CD11b/CD18 ($\alpha_M \beta_2$, Mac-1, CR3) en los neutrófilos activados⁽¹³⁾.

c) Actividad antiapoptótica

La actividad antiapoptótica de la PCa, descrita en diversos estudios, también precisa del sitio enzimático activo y de sus receptores EPCR y PAR-1 (Figura 3B).

Esta actividad depende parcialmente de la modulación de la expresión génica, como se ha descrito antes. Además, la PCa inhibe la activación de varias caspasas, de tal forma que modifica tanto la activación de caspasas iniciadoras (caspasa-8 inducida por tPA)⁽¹⁴⁾ como la de caspasas efectoras (estaurosporina o caspasa-3 inducida por hipoxia o hipoglucemia) (Figura 3B).

Sin embargo, es necesario aclarar con más precisión cómo la PCa ejerce su acción antiapoptótica y

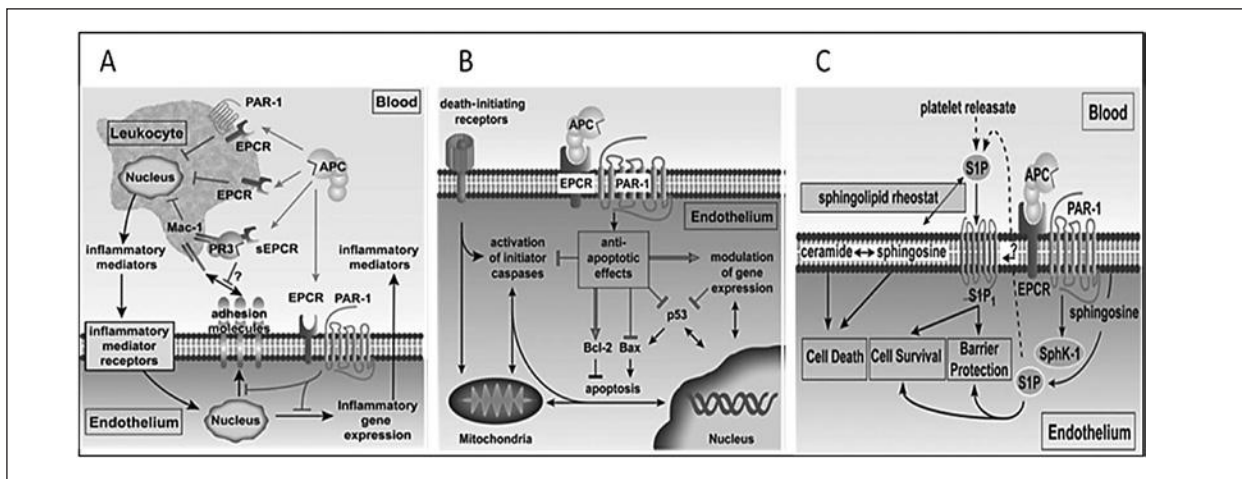


Figura 3. Actividades citoprotectoras de la vía de la proteína C. (A) Mecanismo antiinflamatorio. (B) Mecanismo antiapoptótico. (C) Mecanismo de protección de la barrera endotelial (tomada de L. Mosnier y col. Blood 2007).

cuáles son las contribuciones relativas de sus efectos sobre la expresión génica, tanto de los relacionados con la señalización como con la proteólisis que involucran a receptores particulares o efectores.

d) Estabilización de la barrera endotelial

La rotura de la barrera endotelial es un factor clave en la patogénesis de la inflamación. Sus consecuencias son un aumento de la permeabilidad, tumefacción, mala perfusión e inflamación, unos procesos que contribuyen a la fisiopatología de la sepsis, a la lesión pulmonar aguda y al fallo orgánico.

En este contexto, la PCa actúa como un protector de la función de dicha barrera, pero para ello precisa de los receptores EPCR, PAR-1 y la esfingosina-1-fosfato (S1P)⁽¹⁵⁾. Todos ellos participan en una serie de procesos biológicos que se inician con la activación del PAR-1, el cual estimula a la esfingosina quinasa-1 (SphK-1) para formar S1P. Esta última, mediante la activación de su receptor (S1P1), es la responsable final de un incremento en la protección de la barrera endotelial.

Además de estos efectos, S1P también promueve la supervivencia celular, todo ello participando en los mecanismos que regulan la expresión de los esfingolípidos (ceramida, esfingosina), los cuales representan la puerta de entrada de las señales que inician o previenen la muerte celular (Figura 3C).

Terapia con proteína C activada

Todos estos conocimientos biológicos donde se ha demostrado que la PCa no sólo tiene una actividad anticoagulante, sino que además partici-

pa activamente en los procesos antiinflamatorios y antiapoptóticos, han abierto nuevas perspectivas terapéuticas frente a la respuesta inflamatoria en general.

Como es bien sabido, durante la sepsis se activa la coagulación al aumentar la expresión del factor tisular en el endotelio, los monocitos y los macrófagos, en respuesta a las citoquinas (TNF e interleuquinas [IL]-1 y -6, entre otras) producidas por el estímulo séptico. En este proceso, la PC y la antitrombina se consumen. Más aún, los niveles de expresión de la TM y EPCR disminuyen; eventos que contribuyen al desarrollo de complicaciones trombóticas y a la instauración de una coagulación intravascular diseminada (CID).

En un intento de contrarrestar estos fenómenos biológicos que acompañan a la sepsis, se han puesto en marcha numerosos trabajos experimentales en los que se emplean distintas opciones terapéuticas. Entre ellos hemos de destacar aquellos modelos experimentales donde se usó la proteína C activada en el curso del cuadro séptico.

En este ámbito, se ha indicado que la administración de PCa a babuinos tratados con *Escherichia coli* dio como resultado la prevención del shock y de la CID. Por el contrario, estos efectos no se observaron cuando en estos experimentos se bloqueó la actividad de la PC o bien se impidió la unión de dicha proteína a su receptor, unos resultados que sugieren que la administración de PCa podría ser beneficiosa para el tratamiento de la sepsis⁽¹⁶⁾.

Sin embargo, estos efectos beneficiosos observados con la PC, y teniendo en cuenta sus múltiples actividades, nos obligan a formularnos algunas preguntas: ¿cuáles son los mecanismos fundamentales para que la PCa sea tan beneficiosa en los estados sépticos?; teniendo en cuenta el fracaso de otros anticoa-

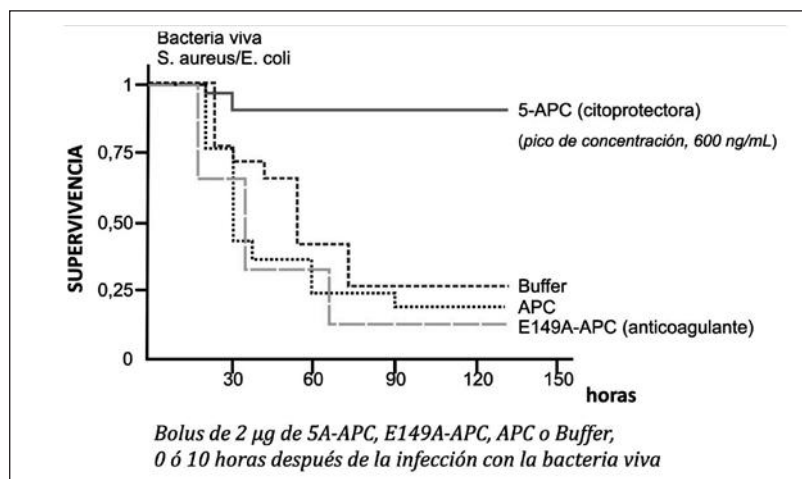


Figura 4. Supervivencia de ratones sépticos (10 µg de LPS) tras la administración de PCa (EJ Kerschen y col. J Exp Med. 2007).

gulantes (como la antitrombina y el inhibidor de la vía del factor tisular) en los ensayos sobre sepsis grave, ¿son una o más las acciones directas fundamentales de la PCa para la reducción de la mortalidad? Para ayudar a responder a estas preguntas se emprendieron una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* con dos variantes “mutadas” de PC obtenidas mediante ingeniería genética.

A este respecto, se han comparado en modelos animales esas formas mutadas con perfiles de actividad alterados de forma selectiva, es decir, habiendo reducido en gran medida la actividad anticoagulante o la citoprotectora. La forma mutada PCa-Glu149Ala (E149A) ha mostrado mayor acción anticoagulante *in vitro* e *in vivo*, pero presenta disminución de los efectos *in vitro* citoprotectores. En cambio, la forma PCa-5A (Lys191-193Ala+ Arg229/230Ala) carecía de actividad antitrombótica *in vivo* y conservaba sus propiedades citoprotectoras.

Los resultados mostraron que, después de un seguimiento de 150 horas, la forma mutada que conservaba su capacidad citoprotectora era eficaz para reducir la mortalidad inducida por endotoxemia en un modelo experimental⁽¹⁷⁾ (Figura 4); es decir, estos datos nos recalcan que la actividad antitrombótica de la PCa no es suficiente para reducir la mortalidad, sino que se precisa de las acciones citoprotectoras para conseguir estos objetivos.

Basados en estos estudios experimentales se han desarrollado preparados comerciales de PCa para su uso en humanos. En este contexto, diversos estudios clínicos controlados frente a placebo en pacientes con sepsis grave han demostrado cómo la administración de PCa limitó la generación de trombina y mejoró la coagulopatía asociada. Más todavía, los pacientes que recibieron PCa mostraron una tendencia hacia la normalización de los niveles de plasminógeno y una

disminución del PAI-1, con un descenso en los niveles de IL-6; todo ello acompañado de una reducción de la respuesta inflamatoria.

El principal estudio donde se reflejan las recomendaciones para el uso de la PCa es un ensayo internacional en fase 3, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, de asignación aleatoria, denominado *Recombinat Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis* (PROWESS), publicado en 2001. En dicho estudio, 1.690 pacientes con sepsis grave recibieron PCa (n = 850) o placebo (n = 840) dentro de las 48 horas del inicio de la primera disfunción orgánica inducida por sepsis.

Los pacientes tratados con PCa [*Drotrecogin alfa-activada* (*DrotAA*)] mostraron una mejoría en la supervivencia a los 28 días en comparación con aquellos tratados con placebo, siendo las tasas globales de mortalidad del 24,7% para el grupo con PCa y del 30,8% para el grupo con placebo (p = 0,005)⁽¹⁸⁾. Además, este fármaco redujo el riesgo de muerte en un 19,4% y aumentó las probabilidades de supervivencia en un 38,1%.

Sin embargo, cuando se realizó un extenso análisis de subgrupos se observó que este efecto no se mantenía en los enfermos con una puntuación en la escala APACHE II menor de 25. En este subgrupo de pacientes menos críticos, el riesgo de efectos adversos era superior al del grupo control. A partir de este estudio, la FDA aprobó el uso de *DrotAA* en Noviembre 2001 en adultos con sepsis severa y alto riesgo de muerte. No obstante, tanto la FDA como la EMEA, teniendo en cuenta el perfil de seguridad y eficacia del fármaco, solo autorizaron el uso de este fármaco en pacientes con determinados criterios de gravedad, y solicitaron estudios complementarios en fase IV.

Posteriormente, se han desarrollado otros trabajos, destacando el estudio ADDRESS⁽¹⁹⁾ (*ADministration of DRotrecogin alfa-activated in Early stage Severe Sepsis*), con un total de 2.613 pacientes (1.316 en el grupo de *DrotAA* y 1.297 en el grupo placebo), en el que se evaluó la eficacia del fármaco en pacientes con sepsis grave y bajo riesgo de muerte. Se advirtió que había una ausencia de efecto beneficioso, junto con una mayor incidencia de complicaciones graves por sangrado. Esto sugiere que *DrotAA* no debería utilizarse en pacientes con sepsis grave y bajo riesgo de muerte, tales como aquellos con fallo de un solo órgano o una puntuación APACHE II < 25.

También se ha estudiado la eficacia y seguridad de este fármaco en la población infantil. El estudio

RESOLVE⁽²⁰⁾ incluyó 477 niños diagnosticados de sepsis grave aleatorizados a recibir DrotAA frente a placebo. Aunque no se registró ninguna eficacia, el perfil de seguridad fue aceptable, salvo en niños menores de 60 días, en los que los episodios de sangrado a nivel del sistema nervioso central fueron superiores que en el grupo placebo.

Todos estos resultados, en su conjunto, sugieren que el sistema de la proteína C desempeña un papel importante frente a la respuesta inflamatoria, desarrollando un efecto beneficioso a través de sus propiedades anticoagulantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Sin embargo, son necesarios más ensayos clínicos para poder seleccionar aquellos pacientes que, por sus características clínicas, puedan beneficiarse de forma significativa de la terapia con PCa frente a la respuesta inflamatoria grave.

Referencias bibliográficas

1. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem.* 1976; 251: 355-363.
2. Griffin JH, Fernández JA, et al. Activated protein C. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 73-80.
3. Dahlbäck B, Villoutreix B. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1311-1320.
4. Dahlbäck B, Stenflo J. The Protein C Anticoagulant System. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Disease*, third ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000: 614-656.
5. Danese S, Vetrano S, et al. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115: 1121-1130.
6. Marlar RA, Mastovich S. Hereditary protein C deficiency: a review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1(3): 319-330.
7. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science.* 2002; 296: 1880-1882.
8. Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 639-643.
9. Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med.* 2003; 9: 338-342.
10. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 11199-11203.
11. Francini N, Bachli EB, Blau N, et al. Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation* 2004; 110: 2903-2909.
12. Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280: 19808-19814.
13. Cao C, Gao Y, Li Y, et al. The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD11b. *J Clin Invest.* 2010; 120(6): 1971-1980.
14. Liu D, Cheng T, Guo H, et al. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med.* 2004; 10: 1379-1383.
15. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005; 105: 3178-3184.
16. Taylor FB, Jr., Chang AC, Esmon CT, Hinshaw LB. Baboon model of Escherichia coli sepsis: description of its four stages and the role of tumor necrosis factor, tissue factors, and the protein C system in septic shock. *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1991; 8-14.
17. Kerschen EJ, Fernández JA, Cooley B, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant-activated protein C. *J Exp Med.* 2007; 204: 2439-48.
18. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New Engl J Med* 2001; 344: 699-709.
19. Abraham E, Laterre PF, Garg R, et al. Drotrecogin Alfa (Activated) for Adults with Severe Sepsis and a Low Risk of Death. *New Engl J Med* 2005; 353: 1332-1342.
20. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, et al. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 836-843.