



La Trombina más allá de la coagulación (Revisión)

Hember Vicci ¹ .

María del Pilar Navarro ² .

Antonio Eblen-Zajjur ³ .

¹Licenciado en Bioanálisis Centro de Biofísica y Neurociencia (CBN)
Departamento Clínico Integral de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la
Salud sede Aragua Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela
hvicci@uc.edu.ve; hember_vicci@yahoo.es

²Dra. en Ciencias mención Bioquímica Centro de Biofísica y Neurociencia
(CBN) Departamento Clínico Integral de Bioanálisis, Facultad de Ciencias
de la Salud sede Aragua. Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela

³Dr. en Ciencias Médicas Centro de Biofísica y Neurociencia (CBN)
Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 27 de Mayo del 2015 a la Revista Vitae Academia
Biomédica Digital.

RESUMEN

La trombina es una proteasa de serina que resulta de la activación proteolítica de protrombina, y cuya función principal en la coagulación es la escisión del fibrinógeno para formar el coágulo de fibrina. Paradójicamente, también interviene en la activación del inhibidor de fibrinólisis activado por trombina y liberación de activadores del plasminógeno, para la generación de plasmina, con consiguiente degradación del coágulo; estableciéndose un equilibrio entre ambos mecanismos. Estudios tanto in vivo como in vitro han demostrado efectos de trombina más allá del proceso de la coagulación; ejerciendo acciones sobre monocitos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares, plaquetas y neuronas,

entre otras; que a su vez inciden directa o indirectamente sobre mecanismos inflamatorios, de proliferación celular y nocicepción. En ese sentido, la presente revisión describe los efectos pleiotrópicos o no hemostáticos de trombina relacionados con patologías inflamatorias, proliferativas; y percepción del dolor nociceptivo y neuropático.

PALABRAS CLAVE: Trombina, coagulación, inflamación, nocicepción, efectos pleiotrópicos

THROMBIN BEYOND CLOTTING

SUMMARY

Thrombin is a serine protease which results from the proteolytic activation of prothrombin, and whose main function in the process of clotting is the cleavage of fibrinogen to form the fibrin clot. Paradoxically, it is also involved in the activation of the fibrinolysis inhibitor activated by thrombin and the release of plasminogen activators to plasmin generation, with consequent degradation of the clot; establishing a balance between the two mechanisms. Studies both in vivo and in vitro have shown effects beyond the thrombin clotting process; exerting actions on monocytes, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, neurons and platelets, among others; which in turn act directly or indirectly on inflammatory mechanisms of cell proliferation and nociception. In that sense, the present review describes the pleiotropic effects or related thrombin hemostatic inflammatory, proliferative diseases; and perception of nociceptive and neuropathic pain.

KEY WORDS: Thrombin, coagulation, inflammation, nociception, pleiotropic effects

LA TROMBINA MÁS ALLÁ DE LA COAGULACIÓN (REVISIÓN)

INTRODUCCIÓN

El sistema de la hemostasia involucra la activación, regulación y coordinación de numerosas proteasas. En condiciones fisiológicas, la hemostasia se inicia, regula y finaliza de manera normal, sin embargo, alteraciones fisiológicas o genéticas pueden conllevar a graves disfunciones que resultan en desordenes hemorrágicos, enfermedades tromboembólicas, proliferativas y/o inflamatorias ⁽¹⁾. Se considera que el papel central en la hemostasia lo representa la trombina, una proteasa de serina, esencial en la coagulación, que presenta actividad sobre numerosos sustratos, y por ende, diversas funciones que incluyen la regulación fisiológica y fisiopatológica vascular ⁽²⁾. En condiciones fisiológicas, la generación de trombina, es necesaria para proteger contra la trombosis y mantener la integridad endotelial vascular; efectos que son mediados a través de enzimas anticoagulantes como la proteína C (PC), cuya activación a proteína C activada (aPC), es favorecida por la unión de trombina a trombomodulina (TM)^(3,4), además, interviene disminuyendo la liberación de interleuquina 12 (IL-12) y regulando la secreción de interleuquina 10 (IL-10) en monocitos, demostrando así, acciones inmunosupresoras y antiinflamatorias ^(5,6). Aunado a ello, la trombina regula la agregación plaquetaria, activación de células endoteliales (CE) y respuestas importantes en la biología vascular a través de la interacción directa y activación proteolítica de sus receptores, conocidos como receptores activados por proteasas (PAR, por sus siglas en inglés Proteinase

Activated Receptor), principalmente PARs-1, 3, y 4 ⁽⁷⁾.

En contraposición a lo anterior, la trombina también ha sido implicada en alteraciones, tales como: disfunción endotelial, estrés oxidativo, reclutamiento de leucocitos, migración y proliferación de células musculares lisas vasculares (CMLV), e interviene en la respuesta inmune y el mecanismo de angiogénesis; quedando en evidencia su asociación a diversos procesos inflamatorios ^(8,9).

Estructura y generación de Trombina

La trombina es una proteasa de serina altamente homóloga a la quimiotripsina, con un residuo de serina en el sitio activo donde se une el sustrato. Su estructura presenta características importantes para la especificidad tales como: lazo- γ , lazo 60 y el residuo S195 en la hendidura del sitio activo. El lazo 60 es una estructura hidrófoba, cuya rigidez es provista por 2 residuos de prolina cercanos (P60b, P60c), que interactúa con residuos hidrófobos ubicados en el sitio de clivaje del extremo N-terminal del sustrato ⁽¹⁰⁾; siendo importante en la activación de éste último ^(11,12). El lazo γ es más móvil e hidrofílico y hace contacto con residuos C-terminal en el sitio de escisión. La estructura de la trombina incluye los exositos I y II. El exosito I se centra sobre residuos K36, H71, R73, R75, Y76, R77a, y K109 /110, y el exosito II incluye residuos R93, K236, K240, R101 y R233 También presenta un sitio de unión para Na⁺, importante para la regulación alostérica ⁽¹⁾. La trombina resulta de la activación proteolítica del zimógeno protrombina de 72 KDa, sintetizado en hígado y liberado a la circulación ⁽⁸⁾. Durante la activación por el factor Xa, la protrombina es clivada en R320 para generar meizotrombina y luego en R271 para generar trombina y el fragmento F1+2 ⁽¹³⁾, el cual contiene los dominios Gla y kringle que permiten a la protrombina unirse a las superficies de membrana. Una vez que la protrombina es activada, la trombina puede separarse del complejo y es libre de actuar sobre sus sustratos: Fibrinógeno (Fg), TM, plaquetas y factores V, VII, XI, XIII, entre otros^(1,14).

Efectos de la Trombina sobre la Hemostasia y la Fibrinólisis

La función principal de la trombina en la coagulación es la escisión del fibrinógeno soluble para formar fibrina insoluble, la base del coágulo hemostático. La escisión de fibrinógeno es un proceso que comprende dos pasos con liberación de dos fibrinopéptidos: A y B (FPA y FPB). Posteriormente, la trombina es capaz de activar al factor XIII, una transglutaminasa que reticula y estabiliza el coágulo, mediante entrecruzamiento covalente entre residuos específicos de glutamina y lisina, localizados en moléculas adyacentes de fibrina ^(15,16).

Una vez que se inicia la coagulación y se genera trombina, este mecanismo es mantenido por los efectos de retroalimentación de la proteasa, con la activación de los factores V, VIII y XI. El factor Va se asocia con el factor Xa en presencia de Ca⁺⁺ y fosfolípidos de membrana (complejo protrombinasa) y escinde la protrombina a trombina, además el factor VIIIa se asocia con el factor IXa en presencia de Ca⁺⁺ y fosfolípidos de membrana (complejo tenasa), induciendo mayor activación del factor Xa; y el factor XIa conduce a la activación del factor IXa, incrementando la generación de trombina. Para complementar su función en la

formación del coágulo de fibrina, la trombina también interviene en la activación de una carboxipeptidasa plasmática, el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI), favoreciendo la lisis del coágulo ^(16,17,18). Por otra parte, la trombina autoregula su generación a través de la unión a TM, que resulta en la activación de PC en aPC (inactivando los factores V y VIII) y a la vez, inhibe su capacidad para formar fibrina y de activar al factor XIII, las plaquetas y proteínas estimulantes de la coagulación ⁽¹⁹⁾. La trombina también tiene efectos indirectos que estimulan la fibrinólisis tales como: quimiotaxis de neutrófilos y liberación de activadores del plasminógeno a partir de células endoteliales, para la generación de plasmina, con consiguiente degradación del coágulo de fibrina ^(19,20,21). Asimismo, actúa en la hemostasia primaria, activando las plaquetas, lo que a su vez favorece la activación del sistema de la fosfolipasa C, la inhibición de la adenilato ciclasa, la movilización de calcio y, en consecuencia, la agregación plaquetaria ^(16,22). Por otro lado, inhibe la acción de ADAMTS13 (desintegrina, metaloproteasa), impidiendo la desestabilización del tapón plaquetario ⁽²³⁾.

EFFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LA TROMBINA

Los efectos de trombina se extienden más allá de la coagulación, ejerciendo acciones a nivel celular, que son mediadas por la activación de los denominados: receptores activados por proteasas (PARs), los cuales pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR), cuyo único mecanismo de acción requiere la escisión proteolítica del residuo N-terminal. Esta escisión expone un nuevo ligando activador que transactiva el receptor ⁽²⁴⁾. La familia PARs incluye 4 miembros: PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4, de los cuales 1, 3 y 4 son activados por trombina pero sólo PAR-1 y PAR-3 contienen el dominio de unión a hirudina, de manera que, PAR-4 por carecer de dicho dominio, es un receptor de baja afinidad; siendo PAR-2 el único receptor no activado por trombina y PAR-1 el principal receptor activado por trombina en la mayoría de las células humanas, CE, CMLV, plaquetas y monocitos ^(25,26).

Ensayos *in vitro* sugieren que las acciones de trombina sobre CE son mediadas principalmente vía PAR-1, induciendo vasorelajación o vasoconstricción dependiente de endotelio y contracción directa del músculo liso vascular en arterias de animales sanos, dependiendo del tipo de vaso sanguíneo y de la especie ^(27,28). *In vivo* se ha observado vasoconstricción independiente de endotelio en humanos ⁽²⁹⁾, mientras que en arterias interlobulares porcinas, la trombina induce una respuesta bifásica del tono vascular, con vasorelajación inicial seguida de vasoconstricción, siendo ambas, dependiente de endotelio⁽²⁾. La vasoconstricción resulta principalmente de la secreción de prostaglandina H₂ (PGH₂) o tromboxano A₂ (TXA₂) ⁽²³⁾, mientras que la vasorelajación se produce principalmente por la síntesis de óxido nítrico (NO), a partir de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la cual compete con la arginasa por el sustrato L-arginina. En tal sentido, se ha sugerido que PARs podrían regular la actividad de eNOS fosforilando la enzima en varios sitios: Ser1177, Ser615, Ser633y Tyr81 incrementando la síntesis de NO, mientras que, al fosforilar Thr495 la

inhiben ⁽³⁰⁾. Estudios señalan que la trombina es capaz de inducir la síntesis de NO, tanto de manera dependiente, como también, independiente de la concentración de Ca^{+2} , en primer lugar, porque es capaz de interactuar con diferentes PARs: 1 ó 4, y luego porque la activación de PAR-4 induce la síntesis de NO sin elevación de Ca^{+2} , la cual se mantiene, aún en presencia de un quelante como BAPTA ⁽²⁾. Otro factor relevante es la vía de señalización celular que se activa, ya que, la fosforilación de eNOS en Ser1177 (en humanos), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt) inducida por trombina, incrementa la síntesis de NO independientemente de la concentración de Ca^{+2} ^(30,31), no obstante, la fosforilación de eNOS en Ser1177 vía RhoA-Rho quinasa, disminuye la síntesis de NO⁽²⁾, además, otras evidencias señalan que la incubación prolongada de CE con trombina inhibe la síntesis de eNOS ^(31,32). Cabe destacar que múltiples estudios *in vitro* señalan que la trombina aumenta la actividad de arginasa, suprimiendo de ese modo la síntesis de NO ^(33,34). Además, la sobreexpresión de arginasa por la trombina disminuye la disponibilidad de L-arginina, reduciendo la producción de NO y aunado a ello, induce la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por desacoplamiento de la eNOS que eventualmente compromete la función endotelial ⁽³⁵⁾. Por otra parte, la trombina, también estimula la expresión de endotelina-1, un potente vasoconstrictor natural, favoreciendo la vasoconstricción⁽²³⁾.

La trombina estimula la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la expresión de sus receptores, y regula su transcripción al inducir la producción de ROS, la expresión de factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) y la síntesis de RNAm de la integrina alfa V/ beta 3 (vitronectina)^(36,37,38,39). VEGF es un potente factor angiogénico y de proliferación en CE, vía receptor tirosina quinasa; siendo la trombina un potente estímulo para su secreción a nivel plaquetario ⁽⁴⁰⁾. Éste, a su vez acelera la generación de trombina ^(41,42), sugiriendo que estos dos factores actúan como parte de un circuito de retroalimentación positiva para acelerar el proceso angiogénico ⁽⁸⁾.

En ese sentido, estudios *in vitro* señalan que la trombina modula los procesos angiogénicos en tejido adiposo, induciendo la secreción de las principales hormonas angiogénicas tales como: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), PDGF y VEGF en adipocitos y de PDGF y VEGF en pre-adipocitos, siendo bloqueados dichos efectos por lepirudina (inhibidor sintético directo de trombina) ⁽²⁴⁾.

Otros efectos celulares de la trombina incluyen el incremento en la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina), activación y reclutamiento de leucocitos, incremento de los niveles plasmáticos de proteína quimiotáctica-1 de monocitos (MCP-1) e interleuquina 6 (IL-6) en fibroblastos, CE, células mononucleares ^(9,23,24), y síntesis de interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-6, MCP-1 y TNF- α en adipocitos, quedando demostrado que interviene en eventos inflamatorios tales como: la obesidad y aterosclerosis ^(24,43,44).

TROMBINA E INFLAMACIÓN

Existe evidencia de que los sistemas de inflamación y coagulación interaccionan, donde la inflamación promueve la activación de la coagulación y ésta a su vez afecta los mecanismos inflamatorios. En efecto, ante una lesión que comprometa la integridad endotelial, el factor tisular (FT) entra en contacto con la sangre y se expresa en CE y/o células sanguíneas, activando el sistema de coagulación ⁽⁴⁵⁾. Una vez generada, la trombina es capaz de activar la respuesta inflamatoria mediante sus efectos celulares sobre CE, CMLV, monocitos, entre otras; que incluyen: la secreción de IL-6, Interleuquina-8 (IL-8), MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1, promoviendo el reclutamiento celular hacia la pared vascular ^(8,9).

La respuesta inflamatoria se compone de eventos locales y/o sistémicos. Los eventos locales resultan en la activación de células inflamatorias, secreción de citoquinas, mediadores vasoactivos y activación del complemento, induciendo vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y en consecuencia, la aparición del edema y enrojecimiento en el sitio de lesión ^(46,47,48). En cambio, los eventos sistémicos se producen en sitios diferentes al de la lesión inicial, favoreciendo el desarrollo de la respuesta de fase aguda caracterizada por leucocitosis, fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda, entre otras ^(49,50). Para ejemplificar tales consideraciones, se han evaluado los cambios sistémicos inducidos a partir de un modelo inflamatorio por inyección subplantar de carragenina en la pata de la rata, demostrando que se producen, tanto eventos locales, evidenciados por la aparición de edema en el sitio de lesión, así como también eventos sistémicos, caracterizados por incremento de los niveles plasmáticos de proteína C reactiva y fibrinógeno; edema pulmonar, deposición de fibrina, infiltración de leucocitos y elevada expresión de FT, IL-6, IL-1 β y TNF α en tejido pulmonar ⁽⁵¹⁾.

Fisiológicamente, la unión de trombina a TM protege contra la inflamación y la coagulación, dado que favorece la activación de PC unida al receptor endotelial de proteína C (EPCR) en la superficie endotelial, sin embargo, dichos sistemas de protección fallan cuando son perturbados por mediadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e IL-1. En condiciones inflamatorias, la supresión de la síntesis, así como la pérdida de proteínas, escindidas por la elastasa de neutrófilos y otras enzimas proteolíticas, disminuyen la reserva vascular anticoagulante; eventos que han sido demostrados en procesos inflamatorios sistémicos (sepsis) o crónicos (aterosclerosis) ^(4,52). Fisiopatológicamente, toxinas tales como: LDL oxidada suprimen la expresión del gen de trombomodulina y la actividad funcional de la misma, adicionalmente, la reducida captura de trombina por TM, junto al aumento de generación de trombina, puede incrementar la disponibilidad de la proteasa para interactuar y activar PARs en la superficie de diversos tipos celulares, incluyendo CE; favoreciendo el estado proinflamatorio. El cambio del estado fisiológico al fisiopatológico se asocia a una modificación en la producción de ligandos (trombina frente a PC), la presencia de PARs frente a TM/EPCR, la localización del complejo enzima-receptor en la superficie celular y la cascada de señalización resultante ^(4,53). En tal sentido, interacciones entre proteasas de la coagulación, células inmunes y mediadores implican no solo la disminución en la regulación de receptores celulares de protección, tales como: TM y EPCR ^(54,55), sino también el enlace de enzimas procoagulantes como la trombina y PARs en células vasculares⁽⁵⁶⁾.

Algunas de las propiedades inflamatorias de la trombina han sido demostradas a partir de modelos de inflamación *in vivo* tales como: modelos de peritonitis en ratones, en los cuales la administración de hirudina disminuye la adhesión de macrófagos activados ante la estimulación con lipopolisacáridos (LPS). En el mismo modelo, la inyección intraperitoneal de trombina purificada estimula la adhesión de macrófagos e incrementa la concentración de IL-6 y MCP-1 en el exudado peritoneal tras la activación de PAR-1 ⁽⁵⁷⁾. Sobre este particular, el inhibidor de trombina dabigatrán, ha demostrado inhibir la expresión de proteínas inflamatorias tales como: factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α), IL-6, MCP-1 y metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), tanto en tejido cerebrovascular de ratones transgénicos con Enfermedad de Alzheimer (EA) como también en cultivos de CE cerebrales en condiciones de hipoxia, demostrando que la trombina es un potente mediador de hipoxia inducida por inflamación y estrés oxidativo en la vasculatura cerebral ⁽⁵⁸⁾.

Cabe destacar también, que experimentos realizados en ratones genéticamente obesos (db/db), demostraron que la trombina inhibe la fosforilación y activación de Akt estimulada por insulina y que en ratones tratados con argatrobán, un inhibidor selectivo de trombina, disminuye la resistencia a la insulina y la infiltración de macrófagos en tejido adiposo, sugiriendo que la trombina representa un enlace molecular entre la coagulación, obesidad e inflamación ^(24,59).

TROMBINA Y ATEROSCLEROSIS

Es oportuno mencionar que uno de los procesos inflamatorios crónicos vasculares es la aterosclerosis, la cual se considera la base patológica de las enfermedades de las arterias coronarias, infarto del miocardio, enfermedad cerebrovascular y arteriopatía periférica⁽⁶⁰⁾. La actividad de trombina se encuentra aumentada significativamente en lesiones ateroscleróticas tempranas en comparación con las lesiones en estadios avanzados, apoyando un rol importante de los efectos celulares mediados por la coagulación sobre el desarrollo inicial de la aterosclerosis ^(61,62).

En tal sentido, la trombina activa y regula proteínas de choque térmico tales como: Hsp70, Hsp90 y Hsp27, expresadas principalmente en CMLV que rodean el núcleo necrótico de la placa aterosclerótica ^(8,63). Asimismo, estimula la proliferación y migración de CMLV mediante regulación positiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la síntesis de colágeno, favoreciendo la acumulación de matriz extracelular, que aunado a la respuesta inflamatoria, fibrótica y quimiotáctica a trombina, contribuyen a la aparición de lesiones vasculares obstructivas ^(8,23,64). Por otra parte, durante el proceso de apoptosis de CMLV (posterior a un daño vascular o en respuesta a cambios en la matriz extracelular), se expone fosfatidilserina en la membrana celular, facilitando el ensamblaje del complejo protrombinasa, acelerando la generación de trombina^(65,66,67), constituyendo un mecanismo de retroalimentación positiva que acelera el proceso aterogénico y que puede proporcionar una

explicación para la proliferación incontrolada de las CMLV después de lesiones vasculares ⁽⁸⁾.

El papel de la trombina en las lesiones vasculares y el proceso aterosclerótico se ha atribuido no sólo a la formación de trombos, sino también a su capacidad para actuar como un potente activador de plaquetas ⁽⁶⁴⁾. En humanos, la activación plaquetaria mediada por trombina se lleva a cabo exclusivamente por la activación de receptores PAR-1 y 4, no obstante, el rol proaterogénico de la trombina en el desarrollo temprano de la placa aterosclerótica no parece depender de la activación de las plaquetas vía PAR-4. La activación de las plaquetas *in vivo*, resulta en la expresión del ligando de CD40 (CD40L) en su superficie ^(9,23), cuyo sistema potencia señales aterogénicas en CE, CMLV y monocitos. La señalización de CD40 es mediada por factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), que son capaces de reclutar quinasas y otros efectores, conllevando a la activación del factor nuclear Kappa Beta (NF- κ B), y por lo tanto, a regulación positiva de moléculas de adhesión, metaloproteasas de matriz, citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento ⁽⁶⁸⁾. Otros mediadores plaquetarios inducidos por trombina, tales como: factor plaquetario-4 (FP-4), citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación (RANTES/CCL5) ⁽⁶⁹⁾ y el péptido activador de neutrófilos (NAP -2)⁽⁷⁰⁾ son depositados por las plaquetas activadas en el endotelio, favoreciendo la detención de leucocitos y posterior trans migración ⁽⁷¹⁾. Siguiendo la misma línea, se ha demostrado que la trombina regula positivamente la expresión de PAR-1, secreción de IL-6 e interferón γ (IFN γ) en células monocíticas diferenciadas U937; asimismo, induce la expresión de CCL2 en monocitos y CE; y da lugar a la transcripción de genes que codifican para IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL3, CCL4, CXCL2, CXCL3 y FT en monocitos humanos, lo que sugiere que la trombina puede contribuir al reclutamiento de leucocitos y un ambiente pro-inflamatorio en lesiones ateroscleróticas ^(72,73).

Otra vía por la cual la trombina puede intervenir en la aterosclerosis, es través de la escisión de proteínas del complemento C3 y C5a a su forma activa, las cuales inducen inflamación y quimiotaxis de células inflamatorias. En efecto, en lesiones ateroscleróticas coronarias en humanos, se sobreexpresan receptores de anafilotoxinas C3aR y C5aR; principalmente en macrófagos, CE, CMLV, células T y mastocitos en comparación con vasos sanguíneos sanos, siendo ambas anafilotoxinas junto al complejo de ataque de membrana relacionados con el proceso aterosclerótico ^(56,73,74,75).

Considerando lo antes planteado, existe evidencia que sugiere la influencia de la actividad de trombina sobre el proceso aterogénico. En ensayos realizados con el inhibidor directo de la trombina melagatrán se demostró que su aplicación en modelos murinos limita las dimensiones de las placas ateroscleróticas y la inestabilidad de las lesiones en avanzado estado de progresión en ratones con aterosclerosis deficientes de apolipoproteína E ⁽⁷⁶⁾. Asimismo, la aplicación de dabigatrán mediante un modelo murino también disminuye la formación y el tamaño de las placas ateroscleróticas y previene la progresión de la enfermedad y la estenosis asociada ⁽⁷⁷⁾. Al respecto, ensayos realizados en ratones deficientes de apolipoproteína E y manipulados genéticamente para presentar niveles reducidos de trombina, han mostrado disminuir la aterosclerosis y el perfil proinflamatorio, además de incrementar la estabilidad de la placa aterosclerótica ⁽⁷⁸⁾.

Por otra parte, la síntesis de ROS se relaciona con múltiples efectos proaterogénicos, implicados en mecanismos de señalización celular, tales como: expresión génica, proliferación, migración o apoptosis. Diversos estudios indican el potente efecto de trombina sobre la producción de ROS en CMLV humanas y plaquetas ^(79,80,81). Diferentes sistemas enzimáticos toman parte en la síntesis de ROS en la vasculatura, tales como: xantina-oxidasa, NOS y la oxidasa de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), siendo ésta última fuente importante de superóxido en células vasculares y miocitos ⁽²³⁾. Las señales mitogénicas inducidas por trombina en CMLV requieren una oxidasa, cuyos componentes p22^{phox} y p47^{phox} son necesarios para la generación de ROS ⁽⁸⁾. Tras estimulación con trombina, p47^{phox} es fosforilado y reclutado hacia la membrana, favoreciendo así el ensamblaje de la oxidasa; además, en modelos de lesión vascular de la carótida en la rata, p47^{phox} es regulado positivamente, sugiriendo que ambos, la oxidasa y p47^{phox} se relacionan con los eventos de señalización que conducen a la formación de lesiones vasculares ^(82,83). Por otro lado, es posible que las señales de transcripción vía MAPK/JNK inducidas por trombina sean dependientes de la generación de ROS mediado por NADPH oxidasa, sugiriendo su implicación indirecta en procesos de diferenciación celular, supervivencia celular y apoptosis ⁽⁸⁴⁾. En tal sentido, estudios han demostrado que la trombina incrementa la producción de ROS en células endoteliales, *in vitro*, mediante la activación de p38 MAPK y PI3K/Akt, favoreciendo la proliferación celular ⁽⁸⁵⁾. Adicionalmente, la trombina *per se*, induce la reexpresión *de novo* de PAR-1 a través de un mecanismo dependiente de Src, incluyendo proteínas G, PI3K, p38 MAPK, lo que sugiere que las vías redox también se relacionan con la expresión y regulación de PAR-1 ⁽²³⁾. Otros estudios señalan, que la trombina induce movilización y mayor captación de Ca²⁺ mitocondrial en cultivos celulares murinos y humanos, incrementando la producción de superóxido derivado de mitocondria (mROS), activando la vía de señalización de NF-κB, favoreciendo la sobreexpresión de ICAM-1 y la adhesión de leucocitos al endotelio vascular ⁽⁸⁶⁾. La influencia de trombina sobre ROS queda de manifiesto en ensayos con ratones hipercolesterolémicos con aterosclerosis deficientes de ApoE en los que la administración oral de dabigatrán (inhibidor directo de trombina) redujo considerablemente el estrés oxidativo en la aorta, sugiriendo que la inhibición de trombina reduce la producción de ROS y favorece la función endotelial ⁽⁷⁷⁾.

TROMBINA, PROLIFERACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Como consecuencia de las acciones celulares de trombina, esta proteasa induce la proliferación y migración de células tumorales, a través de diversos mecanismos, entre los que se destacan: el incremento de la permeabilidad vascular que conlleva a la pérdida de proteínas plasmáticas y desarrollo de una matriz proangiogénica ^(87,88,89); la expresión de moléculas de adhesión celular, que facilita la unión entre células tumorales con la matriz extracelular ⁽⁹⁰⁾; y la activación de la enzima degradante de colágeno tipo IV y la MMP2, que promueve la invasión celular a través de la membrana basal ^(39,87,91).

La trombina induce la progresión de tumores actuando directamente sobre células que expresan PARs. PAR-1 es sobreexpresado en melanoma agresivo ⁽⁹²⁾, cáncer de colon ⁽⁹³⁾, cáncer de próstata ⁽⁹⁴⁾, cáncer de mama invasivo ⁽⁹⁵⁾ e hiperplasia de células epiteliales en glándulas mamarias, un fenotipo oncogénico⁽⁹⁶⁾. La actividad mitogénica de trombina mediada vía PAR-1, está asociada con la activación de ERK ½ ^(97,98), promoviendo no sólo la progresión del ciclo celular sino también la transformación, migración y supervivencia celular. PAR-1 promueve la motilidad celular a través de un mecanismo que implica la activación del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) en carcinoma renal ⁽⁹⁹⁾. Además, PAR-1 activa la integrina $\alpha\beta 5$ en melanoma, promoviendo la migración e invasión ⁽¹⁰⁰⁾ y puede contribuir a la supervivencia de las células tumorales, puesto que, previene la apoptosis de ciertos tipos de células ^(101,102,103).

Estudios realizados demuestran que los efectos quimiocinéticos de trombina sobre células de melanoma metastásico, no son reproducidos al estimular células tumorales prostáticas con péptidos agonistas de PAR-1, pero si con la combinación de péptidos agonistas de PAR-1 y PAR-2 ⁽¹⁰⁴⁾. Puesto que, la metástasis es incrementada por la activación de PAR-2, los efectos prometastásicos de trombina sobre las células tumorales sugieren la activación cruzada de PAR-2 a partir de la secuencia del ligando activador de PAR^(105,106,107).

TROMBINA, DOLOR NOCICEPTIVO Y NEUROPÁTICO

Los PARs se han relacionado con el desarrollo y alteraciones del sistema nervioso central (SNC), que incluyen: la memoria, las enfermedades neurodegenerativas y de las vías dopaminérgicas. PARs son expresados en nervios periféricos; y el desarrollo de agonistas selectivos para PAR-1(TFRIFD) PAR-2 (SLIGKV) y PAR-4 (AYPGKF) ha permitido evaluar los efectos de su activación en la inflamación neurogénica, percepción de dolor, sensación de prurito y regeneración de nervios, entre otros ^(25,108).

En lo que respecta a PAR-1 y PAR-2, su activación se ha asociado a inflamación neurogénica en sistema nervioso periférico (SNP), caracterizada por vasodilatación, edema, pérdida de proteínas, adhesión de leucocitos y respuesta al dolor ⁽¹⁰⁹⁾. Tanto PAR-1 como PAR-2, son expresados en aferentes nociceptivos (fibras C y A δ) ^(110,111) y su activación *in vivo* conlleva a la liberación de neuropéptidos, tales como: Sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), los cuales median la aparición del edema ^(112,113). Diversos estudios se han propuesto dilucidar el papel de PARs en la nocicepción mecánica y térmica, encontrando que la activación de PAR-1 por péptidos agonistas (AP) selectivos tiene efecto analgésico en condiciones normales, o inflamatorias posterior a la aplicación de inyección intraplantar de carragenina en la pata de la rata, sin embargo, al realizar el ensayo con trombina se reproduce el efecto analgésico de AP de PAR-1 ante el estímulo mecánico; pero no ante el estímulo térmico; induciendo y amplificando la respuesta hiperalgésica ⁽¹¹⁴⁾. Esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que la trombina no es un agonista selectivo de PAR-1 sino que, activa otros receptores como PAR-4, que pueden modular su actividad nociceptiva, ya que, se

ha demostrado que la activación de PAR-4 media las respuestas excitatorias en neuronas mientéricas ⁽¹¹⁵⁾.

Por su parte, la activación de PAR-1 y PAR-4 conlleva a analgesia en respuesta a la estimulación térmica y mecánica, de manera que, pudieran potenciar sus funciones con diferente afinidad, tal y como sucede con la activación plaquetaria y endotelial; además, PAR-4 es activado por tripsina y catepsina G, de allí que, los efectos inhibitorios de PAR-1 y/o PAR-4 sobre la transmisión de los mensajes nociceptivos probablemente dependa del tipo de proteasa liberada en la proximidad de los nervios sensoriales ^(116,117). Al respecto, PAR-4 ejerce su efecto inhibitorio directamente sobre neuronas sensoriales, por el contrario, es posible que los efectos inhibitorios de PAR-1 en la nocicepción, sean mediados por un mecanismo indirecto que implica neuronas distintas a las sensoriales, motivado a que, la activación de PAR-1 en neuronas sensoriales promueve la liberación de neuropéptidos pronociceptivos como CGRP y SP ⁽¹¹⁸⁾.

Es oportuno mencionar que, estudios en ratones han demostrado que la inyección intratecal de trombina induce dolor neuropático, caracterizado por hiperalgesia térmica y alodinia táctil, siendo estos efectos suprimidos por la administración intratecal de hirudina (inhibidor directo de trombina). Además, la administración intratecal de receptores de PDGF disminuye la hiperalgesia y alodinia producidas por trombina en ratones normales y también como consecuencia de la ligación del nervio ciático en ratones. Adicionalmente, tanto PDGF como PAR-1 se localizan en asta dorsal medular (ADM), proporcionando evidencia novel de que trombina/PAR-1 y la vía de señalización mediada por PDGF en la médula espinal están directamente involucrados en el desarrollo del dolor neuropático ⁽¹¹⁹⁾.

Conclusiones

La trombina es la principal enzima diana de la terapia anticoagulante, puesto que, su generación es clave en la formación del coágulo de fibrina durante el proceso de coagulación, no obstante, sus propiedades se extienden más allá del proceso de coagulación, incluyendo efectos pleiotrópicos principalmente sobre los mecanismos inflamatorios, enlazando de esta manera ambos procesos. Dichos efectos son mediados a través de la activación de PARs, los cuales son expresados en células endoteliales, células musculares lisas vasculares, neuronas del SNC y periférico bajo condiciones fisiológicas, sin embargo, también se activan en condiciones patológicas tales como: la formación de trombos, inflamación, lesión tisular y cáncer entre otras. La trombina ha mostrado inducir una variedad de efectos no coagulantes como la expresión de moléculas de adhesión, activación de leucocitos, generación de ROS, incremento de los niveles plasmáticos de citoquinas (MCP-1 e IL-6) en fibroblastos, células endoteliales, células mononucleares y adipocitos; promoviendo procesos ateroscleróticos. Por otra parte, la trombina, induce la actividad mitogénica sobre las células musculares lisas y endoteliales, la liberación de factores de crecimiento y quimiocinas que promueven la proliferación y migración de células tumorales. Además, mediante la activación de PAR-1 y PAR-4, la trombina media efectos nociceptivos en neuronas del SNC y SNP, modulando la sensación de dolor. Se requiere ampliar estudios que establezcan los efectos pleiotrópicos de otros factores de la coagulación y su participación en la patogenia de la obesidad, la aterosclerosis, los trastornos proliferativos y neurogénicos. Por otra parte, el posible uso

terapéutico de AP o antagonistas de PARs y de inhibidores de la coagulación (principalmente de trombina) podría ser relevante en el tratamiento de procesos inflamatorios crónicos y de enfermedades proliferativas. Además permitiría modular la transmisión de señales de dolor y la expresión de factores proinflamatorios que acompañan la respuesta neurogénica.

REFERENCIAS

- 1.- Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*. 2005; 106: 2605-12
- 2.- Hirano K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 27-36
- 3.- Carrillo-Esper R, de la Torre T, Rosales A. Complejo trombomodulina, proteína C, receptor endotelial de proteína C en sepsis. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2013; 56: 14-25
- 4.- Spronk HM, Borissoff J, Ten Cate H. New Insights into Modulation of Thrombin Formation. *Curr Atheroscler Rep*. 2013; 15: 1-9
- 5.- Naldini A, Aarde N, Pucci A, Bernini C, Carraro F. Inhibition of interleukin- 12 expression by a-thrombin in human peripheral blood mononuclear cells: a potential mechanism for modulating Th1/Th2 responses. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 980-6
- 6.- Naldini A, Bernini C, Pucci A, Carraro F. Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2005; 78: 736-44
- 7.- Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000; 407: 258-64.
- 8.- Patterson C, Stouffer G, Madamanchi N, Runge M. New tricks for old dogs nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res*. 2001; 88: 987-97.
- 9.- Spronk HM, de Jong AM, Crijns H, Schotten U, Van Gelder I, Ten Cate H. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovascular Res*. 2014; 101: 344-51
- 10.- Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X ray crystal structure of D-Phe-Pro-Argchloromethylketone- inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*. 1992; 1: 426-71
- 11.- Le Bonniec BF, Guinto ER, MacGillivray RT, Stone SR, Esmon CT. The role of thrombin's Tyr-Pro-Pro-Trp motif in the interaction with fibrinogen, thrombomodulin, protein C, antithrombin III, and the Kunitz inhibitors. *J Biol Chem*. 1993; 268: 19055-61

- 12.- Rezaie, AR. Reactivities of the S2 and S3 subsite residues of thrombin with the native and heparin induced conformers of antithrombin. *Protein Sci.* 1998; 7: 349-57
- 13.- Orcutt SJ, Krishnaswamy S. Binding of substrate in two conformations to human prothrombinase drives consecutive cleavage at two sites in prothrombin. *J Biol Chem.* 2004; 279:54927-36.
- 14.- Wu Q, Picard V, Aiach M, Sadler JE. Activation-induced exposure of the thrombin anion-binding exosite. Interactions of recombinant mutant prothrombins with thrombomodulin and a thrombin exosite specific antibody. *J Biol Chem.* 1994; 269: 3725-30
- 15.- Chen R, Doolittle R. γ - γ cross-linking sites human and bovine fibrin. *Biochemistry.* 1971; 10: 4487-91
- 16.- Hongbao M, Young J, Shen C. Thrombin. *J Nat Sci.* 2008; 6: 90-3
- 17.- Broze G. Thrombin-dependent inhibition of fibrinolysis. *Curr Opin Hematol.* 1996; 3: 390-4
- 18.- Van Tilburg N, Rosendaal F, Bertina R. [Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis.](#) *Blood.* 2000; 95:2855-9
- 19.- Esmon CT. The protein C pathway. *Crit Care Med.* 2000; 28:S44-8
- 20.- Sonne O. [The specific binding of thrombin to human polymorphonuclear leucocytes.](#) *Scand J Clin Lab Invest.* 1988; 48: 831-8
- 21.- Fenton J, Ofosu F, Brezniak D, Hassouna H. Thrombin and antithrombotics. *Semin Thromb Hemost.* 1998; 24:87-91.
- 22.- Hayes K, Leong L, Henriksen R, Bouchard B, Ouellette L, Church W, et al. alpha-thrombin - induced human platelet activation results solely from formation of a specific enzyme - substrate complex. *J Biol Chem.* 1994; 269: 28606-12
- 23.- Borissoff J, Spronk H, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 392-403
- 24.- Strande J, Phillips S. Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *Journal Inflamm (Lond).* 2009; 6: 1-10
- 25.- García PS, Gulati A, Levy JH. The role of thrombin and protease-activated receptors in pain mechanisms. *Thromb Haemost.* 2010; 103: 1145-51
- 26.- Canto I, Soh UJ, Trejo J. Allosteric Modulation of Protease-activated Receptor Signaling. *Med Chem.* 2012; 12: 804-11
- 27.- Ku DD, Zaleski JK. Receptor mechanism of thrombin-induced endothelium-dependent and endothelium-independent coronary vascular effects in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22: 609-16
- 28.- Derkach D, Ihara E, Hirano K, Nishimura J, Takahashi S, Kanaide H. Thrombin causes endothelium-dependent biphasic regulation of vascular tone in the porcine renal interlobar

artery. Br J Pharmacol. 2000; 131: 1635-42

29.- Gudmundsdottir I, Lang N, Boon N, Ludlam C, Webb D, Fox K, et al. Role of the endothelium in the vascular effects of the thrombin receptor (protease-activated receptor type 1) in humans. J Am Coll Cardiol. 2008; 51:1749-56

30.- Watts VL, Motley ED. Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. Exp Biol Med (Maywood). 2009; 234: 132-9.

31.- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. Mol Cell Biol. 2002; 22 (24): 8467-77

32.- Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. Circ Res. 2001; 89: 583-90

33.- Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, Kwak BR, Mach F, Mazzolai L, et al. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. Circulation. 2004; 110: 3708-14.

34.- Lewis C, Zhu W, Pavkov ML, Kinney CM, Dicorleto PE, Kashyap VS. Arginase blockade lessens endothelial dysfunction after thrombosis. J Vasc Surg. 2008; 48:441-6.

35.- Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. Hypertension. 2004; 44: 935-43

36.- Tsopanoglou N, Maragoudakis M. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. Semin Thromb Hemost. 2004; 30: 63-9.

37.- Rukoyatkina N, [Begonja A](#), [Geiger J](#), [Eigenthaler M](#), [Walter U](#), [Cambaryan S](#). Phosphatidylserine surface expression and integrin alpha IIb beta 3 activity on thrombin/convulxin stimulated platelets/particles of different sizes. Br J Haematol. 2009; 144: 591-602

38.- Diebold I, [Petry A](#), [Djordjevic T](#), [Belaiba R](#), [Fineman J](#), [Black S](#), et al. Reciprocal regulation of Rac1 and PAK-1 by HIF-1 alpha: a positive-feedback loop promoting pulmonary vascular remodeling. Antioxid Redox Signal. 2010; 13: 399-412

39.- Siller J, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme Focus on *in vitro* and *in vivo* effects. Thromb Haemost. 2011; 106: 1020-33

40.- Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94: 663-8

41.- Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial

cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer*. 1998; 75: 780-6

42.- Tsopanoglou N, Maragoudakis M. On the mechanism of thrombin induced angiogenesis: potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem*. 1999; 274: 23969-76

43.- Marin V, Farnarier C, Gres S, Kaplanski S, Su M, Dinarello C, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood*. 2001; 98: 667-73.

44.- Levi M, Keller TT, Van Gorp E, Ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*. 2003; 60: 26-39.

45.- Levi M, Van der Poll T, Schultz M. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 167-79

46.- Florez, J. *Farmacología Humana*. 4ta. ed. España. Editorial Masson. 2003

47.- Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Inmunología*. 5ta. ed. México. McGraw-Hill Interamericana. 2004

48.- Parham, P. *Inmunología*. 2da. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2006.

49.- Cecilliani F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: The acute-phase proteins. *Protein Pept lett*. 2002; 9: 211-23

50.- Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colsonna-Romano G, Franceschi C, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing*. 2005; 2: 1-14.

51.- Vázquez, E, Navarro M, Salazar Y, Crespo G, Bruges G, Osorio C, et al. Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Inflamm. Res*. 2015; 64:333-42.

52.- Levi M, Van der Poll T, Schultz M. New insights into pathways that determine the link between infection and thrombosis. *Neth J Med*. 2012; 70: 114-20

53.- Rezaie, AR. The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the PAR-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases. *IUBMB Life*. 2011; 63: 390-6

54.- Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 107-25.

55.- Esmon CT. Protein C anticoagulant system anti-inflammatory effects. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 127-32

56.- Borissoff J, Spronk H, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 364:1746-60

57.- Szaba FM, Smiley ST. Roles for thrombin and fibrinogen in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*. 2002; 99:1053-9.

- 58.- Tripathy D, Sanchez A, Yin X, Luo J, Martinez J, Grammas P. Thrombin, a mediator of cerebrovascular inflammation in AD and hypoxia. *Front Aging Neurosci.* 2013; 19: 1-9.
- 59.- Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, [Yoshida S](#), [Kinouchi M](#), [Kurahashi K](#), et al. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology.* 2010; 151: 513-9
- 60.- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006; 86: 515-81.
- 61.- Borissoff J, Heeneman H, Kilinc E, Kassak P, Van Oerle R, Winckers K, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation.* 2010; 122: 821-30
- 62.- Borensztajn K, Spek CA. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15: 341-9
- 63.- Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18915-24.
- 64.- Hamilton JR, Cornelissen I, Mountfordy JK, Coughlin SR. Atherosclerosis proceeds independently of thrombin-induced platelet activation in ApoE2/2 mice. *Atherosclerosis.* 2009; 205: 427-32
- 65.- Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation.* 1997; 95 (4): 981-7
- 66.- Baker A, Zaltsman A, George S, Newby A. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro: TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; 101:1478-87
- 67.- Walsh K, Smith R, Kim H. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res.* 2000; 87:184-8
- 68.- Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2007; 17:118-23
- 69.- Von Hundelshausen P, Weber K, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PY, Ley K, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 103: 1772-7.
- 70.- Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost.* 1996; 76:780-5
- 71.- Pitsilos S, Hunt J, Mohler E, Prabhakar A, Poncz M, Dawicki J, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost.* 2003; 90: 1112-20
- 72.- Lopez ML, Bruges G, Crespo G, Salazar V, Deglesne PA, [Schneider H](#), et al. Thrombin

selectively induces transcription of genes in human monocytes involved in inflammation and wound healing. *Thromb. Haemost.* 2014; 112: 992-1001.

73.- Koch M, Zerneck A. The Hemostatic System as a Regulator of Inflammation in Atherosclerosis. [IUBMB Life](#). 2014; 66:735-44

74.- [Amara U](#), [Flierl M](#), [Rittirsch D](#), [Klos A](#), [Chen H](#), [Acker B](#), et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. [J Immunol](#). 2010; 185: 5628-36

75.- Speidl W, Kastl S, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe?. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9: 428-40.

76.- Bea F, Kreuzer J, Preusch M, Schaab S, Isermann B, Rosenfeld M, et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler ThrombVasc Biol.* 2006; 26: 2787-92.

77.- Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, Baumhakel M, Bohm M. The Effects of Direct Thrombin Inhibition with Dabigatran on Plaque Formation and Endothelial Function in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 343: 253-7.

78.- Borissoff J, Otten J, Heeneman S, Leenders P, Van Oerle R, Soehnlein O, et al. Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein E-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil dependent manner. *PLoS ONE*. 2013; 8:e55784

79.- Brandes R, Viedt C, Nguyen K, Beer S, Kreuzer J, Busse R, et al. Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2001; 85:1104-10

80.- Gorlach A, Diebold I, Schini V, Berchner U, Roth U, Brandes R, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res.* 2001; 89: 47-54

81.- Wachowicz B, Olas B, Zbikowska H, Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 2002; 13:175

82.- Ushio M, Zafari A, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K. p22^{phox} is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 271: 23317-21.

83.- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 1999; 401: 79-82.

84.- Kanda Y, Mizuno K, Kuroki Y, Watanabe Y. Thrombin-induced p38mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol.* 2001; 132:1657-64.

85.- Djordjevic T, Pogrebniak A, Belaiba R, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, et al. The expression of the NADPH oxidase subunit p22 phox is regulated by a redox-sensitive pathway in

endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38: 616-30.

86.- Hawkins B, Solt L, Chowdhury I, Kazi A, Abid M, Aird W, et al. G protein-coupled receptor Ca²⁺-linked mitochondrial reactive oxygen species are essential for endothelial/leukocyte adherence. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 7582-93.

87.- Rickles F, Patierno, Fernandez P. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003; 124: 58S-68S

88.- Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11: e19.

89.- Petaja J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb Res*. 2011; 127: S34-7

90.- Franchini M, [Montagnana M](#), [Favaloro EJ](#), [Lippi C](#). The bidirectional relationship of cancer and hemostasis and the potential role of anticoagulant therapy in moderating thrombosis and cancer spread. *Semin Thromb Hemost*. 2009; 35: 644-53

91.- Shirvaikar N, [Marquez LA](#), [Ratajczak MZ](#), Janowska A. Hyaluronic acid and thrombin upregulate MT1-MMP through PI3K and Rac-1 signaling and prime the homing-related responses of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2011; 20: 19-30.

92.- Tellez C, McCarty M, Ruiz M, Bar-Eli M. Loss of activator protein-2 results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J Biol Chem*. 2003; 278: 46632-42

93.- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induce cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am. J. Pathol*. 2003; 162: 1503-13

94.- Chay C, Cooper C, Gendernalik J, Dhanasekaran S, Chinnaiyan A, Rubin M, et al. A functional thrombin receptor (PAR1) is expressed on bone-derived prostate cancer cell lines. *Urology*. 2002; 60: 760-5

95.- Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru S, Maoz M, Ginzburg Y, et al. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med*. 1998; 4: 909-14

96.- Yin Y, Salah Z, Grisaru S, Cohen I, Even-Ram S, Maoz M, et al. Human protease-activated receptor-1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 940-4.

97.- Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. *J Biol Chem*. 1992; 267: 13369-75

98.- Trejo J, Connolly A, Coughlin S. The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. Loss of responses in fibroblasts from receptor knockout mice. *J Biol Chem*. 1996; 271: 21536-41

- 99.- Bergmann S, Junker K, Henklein P, Hollenberg M, Settmacher U, Kaufmann R. PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncol. Rep.* 2006; 15: 889-93
- 100.- Even-Ram S, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz B, Gutwein P, et al. Tumor cell invasion is promoted by protease-activated receptor-1 in cooperation with the alpha v beta 5 integrin. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10952-62
- 101.- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalasco R, Fernandez J, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron.* 2004; 41: 563-72
- 102.- Zania P, Kritikou S, Flordellis C, Maragoudakis M, Tsopanoglou N. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318: 246-54
- 103.- Arora P, Ricks T, Trejo J. 2007. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J Cell Sci.* 2007; 120: 921-8
- 104.- Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR2 contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res.* 2004; 2: 395-402
- 105.- O'Brien P, Prevost N, Molino M, Hollinger M, Woolkalis M, Woulfe D, et al. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13502-9
- 106.- Belting M, Jasimuddin A, Wolfram R. Signaling of the Tissue Factor Coagulation Pathway in Angiogenesis and Cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1545-50
- 107.- Rothmeier AS, Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. [Semin Immunopathol.](#) 2012; 34:133-49
- 108.- Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg M, Power C. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Neurosci.* 2003; 4: 981-90
- 109.- Vergnolle N, Wallace J, Bunnett N, Hollenberg M. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22: 146-52.
- 110.- Ossovskaya V, Bunnett N. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84: 579-621.
- 111.- Saito T, Bunnett NW. Protease-activated receptors: regulation of neuronal function. *Neuromolecular Med.* 2005; 7: 79-99.
- 112.- Green B, [Bunnett N](#), [Kulkarni-Narla A](#), [Steinhoff M](#), [Brown D](#). Intestinal type 2 proteinase-activated receptors: expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295: 410-6
- 113.- De Garavilla, [Vergnolle N](#), [Young SH](#), [Ennes H](#), [Steinhoff M](#), [Ossovskaya VS](#), et al. Agonists of

proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. Br J Pharmacol. 2001; 133: 975-87

114.- Asfaha S, Brussee V, Chapman K, Zochodne D, Vergnolle N. Proteinase-activated receptors-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. Br J Pharmacol. 2002; 135: 1101-6

115.- Gao C, Liu S, Hu H, Gao N, Kim G, Xia Y, et al. Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. Gastroenterology 2002; 123: 1554-64

116.- Kahn ML, Zheng YW, Huang C, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. Nature. 1998; 394: 690-4

117.- Kataoka H, Hamilton J, McKemy D, Camerer E, Zheng Y, Cheng A, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. Blood. 2003; 102: 3224-31

118.- Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, et al. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. Br J Pharmacol. 2007; 150: 176-85

119.- Narita M, [Usui A](#), [Narita M](#), [Niikura K](#), [Nozaki H](#), [Khotib J](#), et al. Protease-activated receptor-1 and platelet-derived growth factor in spinal cord neurons are implicated in neuropathic pain after nerve injury. J Neurosci. 2005; 25: 10000-9