

Reconocimiento a la trayectoria de la Prof.^a Dra. Lucía C. Kordich

Variabilidad de las redes de fibrina*

Fibrin network variability

► Ana María Lauricella¹

1. Doctora de la Universidad de Buenos Aires.
Área Química Biológica.

* Laboratorio de Hemostasia y Trombosis.
Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

La fibrina (polímero del fibrinógeno) es una malla proteica constituyente del tapón hemostático. Esta red se caracteriza principalmente por su estructura espacial, las dimensiones de sus fibras, el grado de ramificación, porosidad, elasticidad y rigidez, propiedades que dependen de factores como temperatura, concentración de iones y otras sustancias plasmáticas, pero principalmente de fibrinógeno, trombina y factor XIII. Cuando aumentan las concentraciones de fibrinógeno o trombina, las redes de fibrina son más densas, de menor porosidad y formadas por fibras más cortas. Las alteraciones de la molécula de fibrinógeno pueden producir fibrina anormal, de diferente disolución, ya sea que permanezca tiempos prolongados en circulación induciendo la formación de otros trombos, o bien que se degrade anticipadamente produciendo riesgo hemorrágico. El aumento de calcio incrementa la rigidez y porosidad de la red. La fibrina tiene una importante función como cofactor de la fibrinólisis. La activación del plasminógeno y la acción de la plasmina sobre la fibrina dependen de la estructura de la red. Las redes compactas son lisadas más lentamente, mientras que dentro del mismo gel, las fibras delgadas son disueltas antes que las gruesas. Por otra parte, fibras gruesas resultan mejores cofactores de la activación del plasminógeno. Conocer estos factores facilita la comprensión de situaciones fisiopatológicas que producen diferente respuesta fibrinolítica fisiológica o inducida por fármacos.

Palabras clave: fibrina * propiedades de la fibrina * fibrinógeno * fibrin-formación

Summary

Fibrin is a protein network present in the clot. It can be characterized by its structure, fibers dimensions, ramification degree, porosity, viscoelasticity and deformability. All these properties depend on temperature, ions concentrations and on other plasmatic substances, mainly fibrinogen, thrombin and factor XIII. Greater fibrinogen or thrombin concentrations produce more dense, less porous and shorter fibered-fibrin networks. Fibrinogen alterations can generate abnormal fibrin, with different susceptibility to lysis, while calcium ions increase the fibrin networks' rigidity and porosity. Plasminogen activation and fibrinolysis rate are strongly dependent on the size and the fibrin network architecture. Tight networks are lysed more slowly while, within the same gel, thin fibers are lysed before thick ones. Otherwise, thicker fibers proved to be a better cofactor of plasminogen activation. Taking into account these factors helps understand the different fibrinolytic response, mainly when it is not explained by laboratory studies.

Key words: fibrin * fibrin properties * fibrinogen * fibrin-formation

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

La fibrina no es igual en todos los casos, ya que existen muchas variaciones de la estructura de la red a causa de diferentes situaciones fisiológicas, como también alteraciones en sus propiedades vinculadas a trastornos patológicos.

La fibrina constituye el soporte del tapón hemostático. Es una malla proteica resultante de la polimerización del fibrinógeno (Fbg). Por lo tanto, conocer la estructura y propiedades del Fbg es fundamental para interpretar las interacciones en la fibrina.

ESTRUCTURA Y SITIOS CONSTITUTIVOS DEL FIBRINÓGENO

El Fbg (Fig. 1) es una glicoproteína de gran tamaño (340 kD) formada por tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes ($A\alpha$, $B\beta$ y γ) unidas por puentes disulfuro (1). La molécula de estructura alargada (45 nm de longitud y 9 nm de diámetro) está dividida en tres secciones: el nódulo central, llamado dominio E, está formado por los 6 extremos aminoterminal de las cadenas proteicas, unidos por puentes disulfuro, mientras los dos nódulos externos D están formados por los extremos carboxi-terminal. Los segmentos centrales de las tres cadenas polipeptídicas se enrollan formando una triple α -hélice, conocida como hélice enrollada (región *coiled-coil*) que proporcionan flexibilidad y estabilidad mecánica a la molécula (2). El extremo carboxi-terminal de la cadena $A\alpha$, llamado dominio αC , es un brazo flexible que puede variar su posición y conectarse con otras moléculas de Fbg (3).

La estructura primaria de cada cadena polipeptídica humana (Tabla I) ha sido determinada (1). El Fbg es una molécula muy heterogénea. Por un lado existen variantes fisiológicas de la secuencia aminoacídica de las cadenas $A\alpha$ y γ , modificando el peso molecular (PM), las cargas y funciones de la proteína (4). Por otra parte, la unión covalente de carbohidratos a las

Tabla I. Cantidad aminoacídica y peso molecular (PM) de las cadenas polipeptídicas constituyentes de fibrinógeno.

Cadena	Nº aminoácidos	PM (kDa)
$A\alpha$	610	66,5
$B\beta$	461	52,0
γ	411	46,5

tres cadenas polipeptídicas también modifica su PM. La variante $A\alpha E$ (5) (6) contiene 236 aminoácidos adicionales respecto a la cadena $A\alpha$ y está presente en el Fbg de alto PM, de 420 kDa, que posee menor concentración en plasma normal que el Fbg más abundante (70% del Fbg total circulante) de 340 kDa.

La variante γ' cambia 4 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la cadena γ , por una secuencia de 20 aminoácidos aniónicos que le permiten transportar trombina y factor XIII (F XIII) (7). La presencia de las cadenas γ y/o γ' determina que coexistan otras tres variantes de Fbg de distinto PM: Fbg 1 (con $\gamma\text{-}\gamma$, 85% del Fbg total), Fbg 2 ($\gamma\text{-}\gamma'$, 15% del Fbg total) y Fbg 3 ($\gamma'\text{-}\gamma'$, 1% del Fbg total) (8).

En el Fbg hay sitios constitutivos con funciones bien definidas (Fig. 2). En los dominios D se encuentran los que participan en el proceso de ensamble de la fibrina. Los sitios DD contribuyen a alinear perfectamente los monómeros de fibrina, mientras los sitios D_A o D_B son pocillos donde van a insertarse respectivamente porciones de las cadenas A y B de monómeros vecinos. El sitio γ_{XL} interviene en el ensamble de la fibrina y al mismo tiempo ubica a las moléculas en la posición exacta para que el F XIII activado (F XIIIa) catalice la transglutaminación (9).

Existen sitios de unión a proteínas del sistema de coagulación (Fig. 3) (10) (11). En el dominio E, la trombina se une al Fbg a través del sitio sustrato y de un sitio no sustrato de baja afinidad, es decir, donde la trombina no puede ejercer su actividad biológica. Además, en el extremo C-terminal de la cadena γ' el Fbg posee otro sitio de

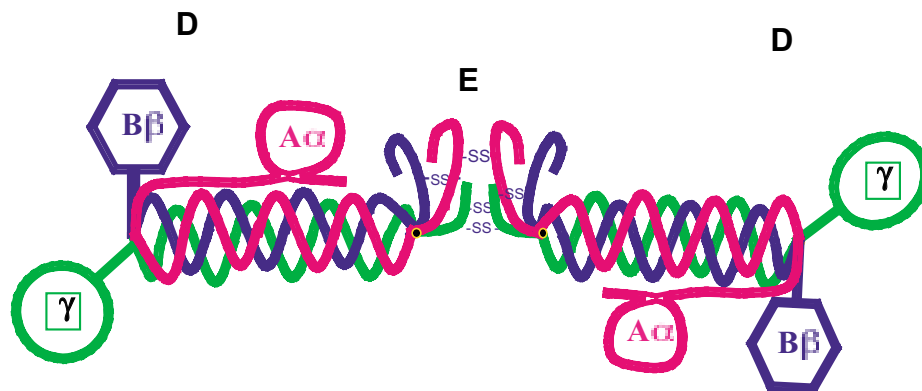


Figura 1. Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Cada color representa una cadena polipeptídica.

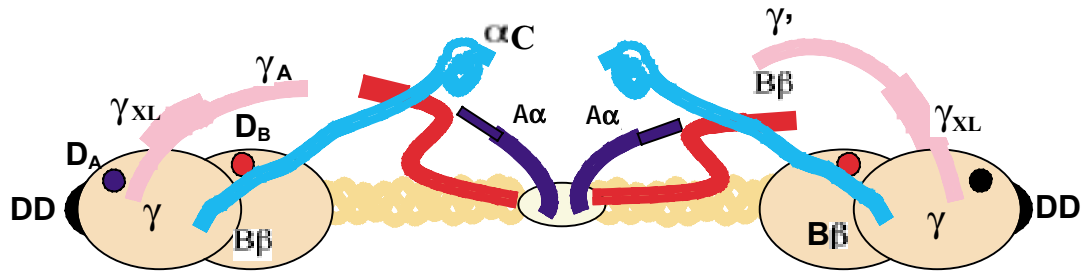


Figura 2. Sitios del Fbg que intervienen en el ensamble de la fibrina. Tomado de *Biochemistry* 1996; 35: 10448-53 (9).

alta afinidad para trombina y un sitio de unión a la subunidad B del F XIII, de modo que los Fbg 2 y 3 transportan trombina y al precursor de la transglutaminasa (12).

El Fbg también transporta proteínas fibrinolíticas (Fig. 3) (13). En la región αC tiene sitios de unión a α₂-antiplasmina, al activador tisular del plasminógeno (t-PA) y de alta afinidad para plasminógeno (14). Estos sitios están dispuestos de tal manera que el t-PA no puede activar al plasminógeno. Además, una lipoproteína (a) Lp(a) y glicoproteína rica en histidina (HRGP), las que compiten con el plasminógeno disminuyendo la función fibrinolítica (10).

El Fbg tiene numerosas interacciones con diferentes células e interviene en variados procesos, como distribución, adhesión y señalización plaquetaria (15), proliferación de fibroblastos y célula endotelial (16), cicatrización (17) y respuesta inflamatoria (18), por interactuar con leucocitos, principalmente neutrófilos. El Fbg se une a proteínas como fibronectina (19) (facilitando su incorporación a la matriz extracelular), factores de crecimiento para fibroblastos (FGF-2, β-FGF) (20) y endotelio vascular (VEGF) (21) que estimulan la angiogénesis y a interleucina-1β (IL_{1β}) que interviene en inflamación (22).

FIBRINOFORMACIÓN

La formación de la red de fibrina es el proceso por el cual el Fbg soluble es convertido en fibrina insoluble por acción de la trombina y del F XIIIa. Para facilitar su estudio se la divide en tres etapas principales:

proteólisis del fibrinógeno por la trombina, polimerización de los monómeros de fibrina y estabilización de la fibrina por F XIIIa.

Proteólisis del fibrinógeno por la trombina

La trombina cliva cuatro enlaces arginina-glicina específicos de los extremos aminoterminales de las cadenas Aα y Bβ de la molécula de Fbg, liberando los fibrinopéptidos A y B. En el monómero de fibrina se conservan 4 porciones remanentes de las cadenas clivadas (*knobs*), dos de las cadenas Aα y dos de las Bβ (respectivamente A y B en la Fig. 4) (23).

Polimerización de los monómeros de fibrina

Los monómeros de fibrina se ubican por su densidad de carga, permitiendo que los nuevos sitios A y B interactúen respectivamente con los sitios complementarios D_A y D_B de monómeros vecinos, para formar una doble cadena compuesta de monómeros alineados. El proceso de elongación involucra la unión de monómeros adicionales que se unen por contacto D-D entre monómeros contiguos (de una misma hilera) además de otro D-E entre monómeros adyacentes (de hileras diferentes) (24). Ambas cadenas están desplazadas, una respecto a la otra, la longitud de medio monómero. El contacto D-E aporta estabilidad a la elongación del polímero.

El extremo carboxi-terminal de la cadena γ tiene al menos cinco sitios de unión a dominios E de otros mo-

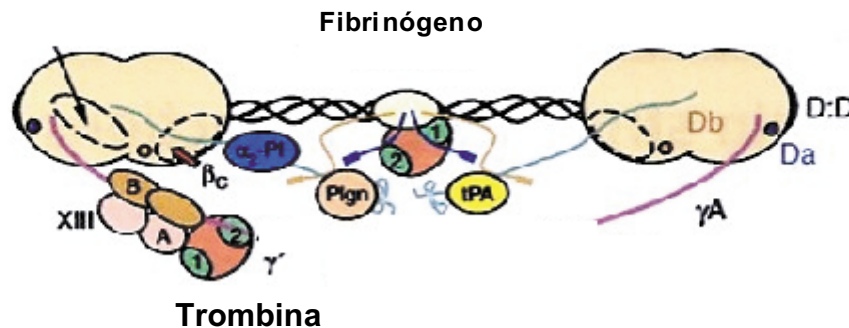


Figura 3. Sitios de unión a proteínas de los sistemas de coagulación y fibrinolíticos. Tomado de *J Thromb Haemost* 2005; 3 (8): 1894-904 (11).

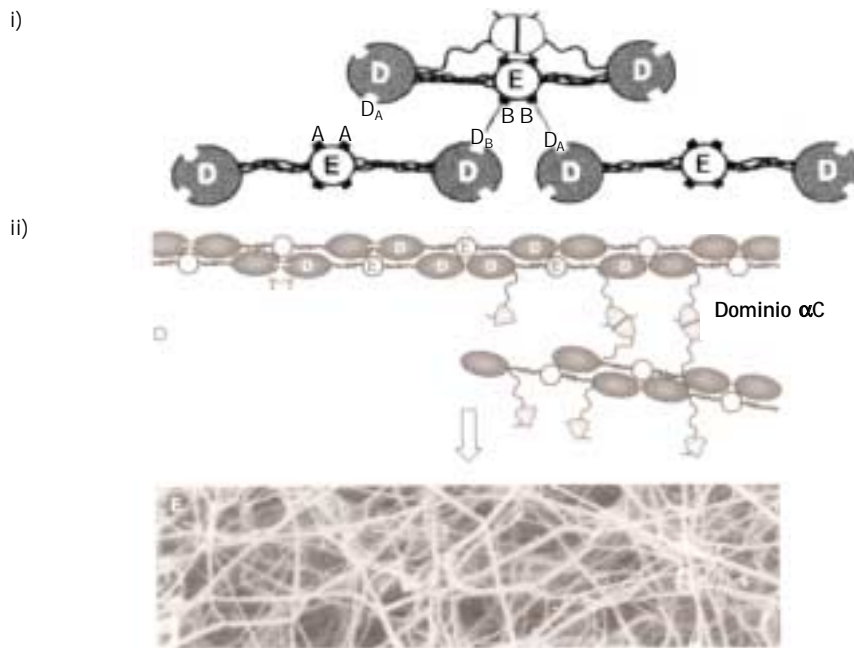


Figura 4. Formación de la red de fibrina. i) Interacción A-DA y B-DB entre monómeros. ii) Los dominios αC facilitan la unión entre microfibras para formar fibras de mayor calibre. Tomado de *Thromb Haemost* 2003; 89: 409-19 (23).

números y permite la formación de una estructura tridimensional de fibrina. Luego de la formación de largas microfibras, éstas pueden ensamblarse lateralmente con otras microfibras mediante interacciones débiles, generando fibras más gruesas. Durante el ensamble de la fibrina los dos dominios αC de una molécula de fibrinógeno se disocian y se reasocian intermolecularmente por interacciones no covalentes, favoreciendo la

agregación bilateral para formar haces de mayor grosor (Fig. 4) (25). Estas uniones pueden originar ramificaciones donde una de las ramas es más gruesa que las otras. Otro tipo de ramificación se produce durante la formación de la microfibra por unión equilateral, donde tres monómeros de fibrina se conectan convenientemente de manera que forman tres fibras de igual grosor (Fig. 5) (11).

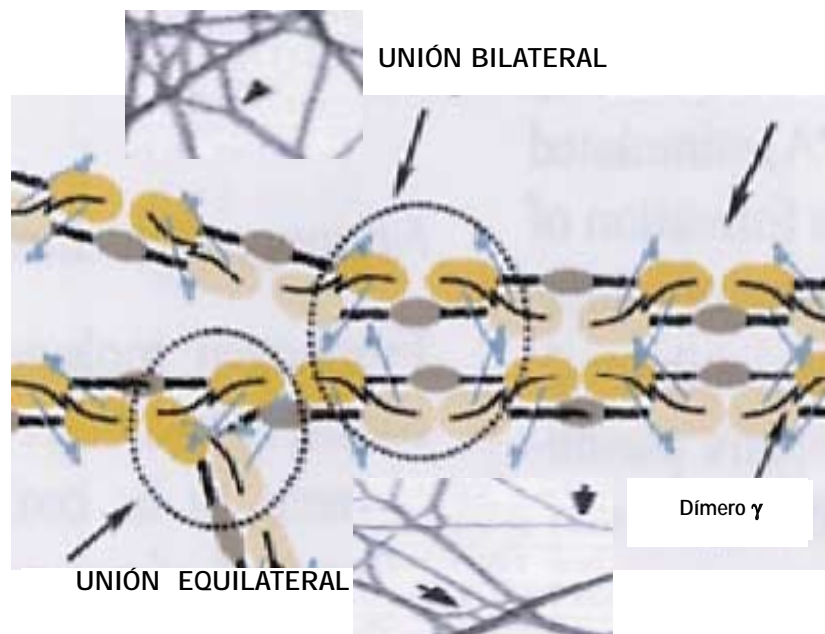


Figura 5. Ramificaciones de microfibrillas por unión bilateral y equilateral. Tomado de *Thromb Haemost* 2002; 87 (4): 651-8 (10) y *J Thromb Haemost* 2005; 3 (8): 1894-904 (11).

Estabilización de la fibrina por el F XIII

La fibrina soluble se entrecruza por acción del F XIIIa, generando fibrina estable. El F XIII plasmático es un tetrámero que contiene dos cadenas A y dos B, unidas no covalentemente por fuerzas de alta afinidad. La subunidad A posee el sitio activo mientras que la B realiza funciones de transporte y regulación de la actividad de la subunidad A. El F XIII plasmático es activado fisiológicamente por trombina a F XIIIa, en una reacción dependiente de iones calcio. El F XIIIa es una transglutaminasa que cataliza la formación de una amida entre el grupo amino de los residuos lisina y el grupo carbonilo de residuos glutamina, liberando amoníaco (Fig. 6) (26). Esta reacción puede producirse entre dos cadenas γ , dos α o una γ con una α de distintas moléculas. Se han propuesto dos tipos de entrecruzamiento (Fig. 7) (10): el **longitudinal** liga los extremos de dos monómeros alineados (*crosslinking end to end*), mientras el **transversal** entrecruza cadenas γ de dos monómeros de hileras diferentes. Si bien exist

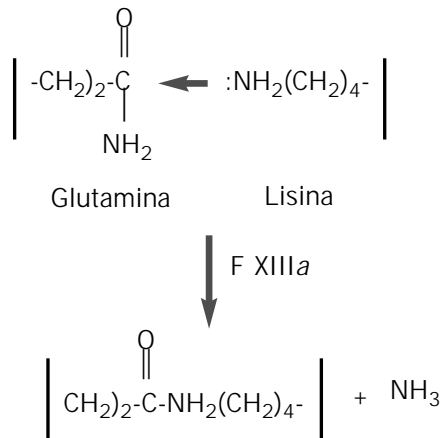


Figura 6. Reacción de transglutaminación catalizada por el F XIIIa.

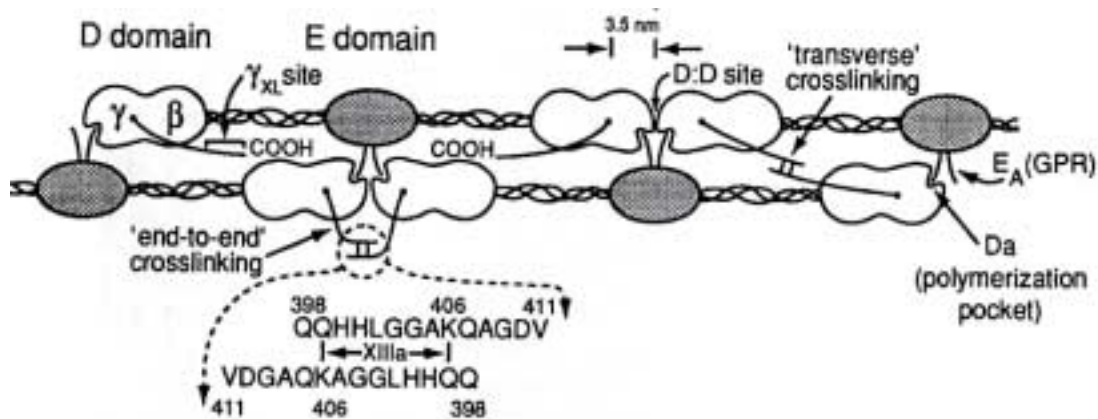


Figura 7. Esquema de entrecruzamiento longitudinal (end-to-end) y transversal de fibrina por F XIIIa. Tomado de *Thromb Haemost* 2002; 87 (4): 651-8 (10).

ten controversias respecto a cuál de ellos ocurre, se han reportado experiencias que demuestran que las microfibras pueden elongarse elásticamente al doble de su tamaño original. Esta elasticidad de las fibras sólo sería explicable por entrecruzamiento transversal (Fig. 8) (11).

ESTUDIO DE LA FIBRINA

La fibrina puede ser caracterizada por diferentes propiedades, importantes para la detección de alteraciones. Las más estudiadas son la cinética de formación de la fibrina, la estructura, permeabilidad, elasticidad y compactabilidad, entre otras.

La cinética de fibrinoformación puede estudiarse determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo. Las curvas resultantes pueden ser sigmoideas o exponenciales (ejemplos en Figuras 14 y 10 respectivamente) y son caracterizadas mediante: **la fase lag** (sólo presente en las curvas sigmoideas, que corresponde al tiempo de inicio de la coagulación); **la pendiente** (que representa la velocidad de fibrinoformación) **DO máxima** (asociada a la densidad de la estructura final de la fibrina) (27) (28).

La estructura de la fibrina, generalmente evaluada por microscopía electrónica de barrido (MEB) o microscopía confocal, es muy variada (Fig. 9). La arquitectura global puede ser homogénea (ya sea compacta o abierta) o heterogénea (si posee poros o nudos). Puede cuantificarse el número de ramificaciones por área y diferenciarse las uniones bilaterales o equilaterales, descritas anteriormente. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras delgadas, muy ramificadas, mientras que una estructura abierta generalmente se vincula con fibras gruesas (29). La diferente estructura de la fibrina es un factor determinante de su velocidad de lisis (30).

El grado de entrecruzamiento de la fibrina por F XIIIa puede evaluarse utilizando electroforesis en

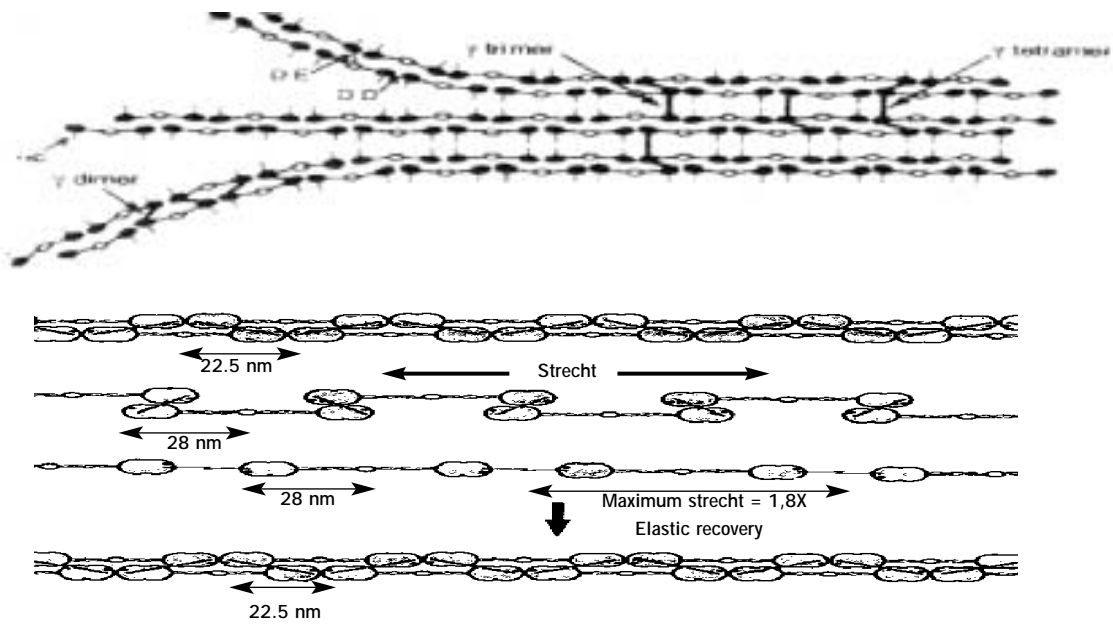


Figura 8. El esquema de entrecruzamiento transversal explica la elongación elástica de las fibras a 1,8 veces su longitud original. Tomado de *J Thromb Haemost* 2005; 3 (8): 1894-904 (11).

geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) (31).

La permeabilidad de la fibrina se estudia midiendo el flujo de fluido a través del gel (27). Se evalúa principalmente a través del coeficiente de permeabilidad específica (Ks) que aumenta cuanto más permeable sea el gel. La relación masa/largo de las fibras (μ), (calculado a partir de Ks y del nivel de Fbg plasmático), presenta un valor disminuido cuando la estructu-

ra de la fibrina está alterada, posiblemente por cambios en la hidratación o en las dimensiones de la arquitectura de la red.

Las propiedades viscoelásticas, cuantificadas por estudios reométricos (32) (33), evalúan la consistencia de la fibrina, principalmente a través del módulo elástico (G' , asociado a la dureza y rigidez del material) y del módulo viscoso (G'' , vinculado con la deformabilidad y la viscosidad del componente fluido). Estos pa-

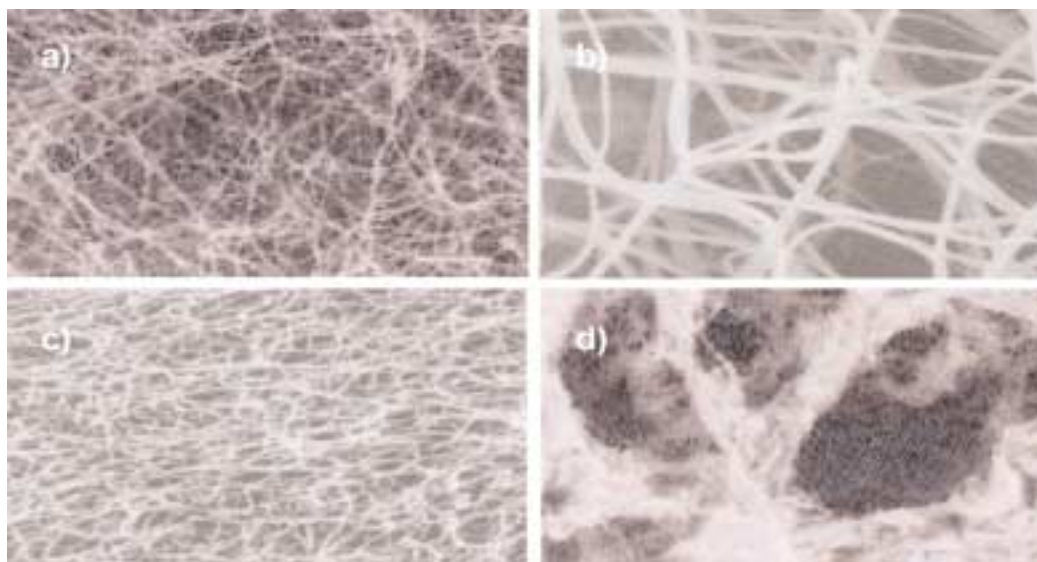


Figura 9. Arquitectura global de las redes de fibrina: a) homogénea, b) homogénea abierta, c) homogénea compacta, d) heterogénea compacta con grandes poros.

rámetros evalúan la respuesta del material a pequeñas deformaciones, sin alterar su estructura, mientras la compactabilidad cuantifica el colapso de las fibras ante grandes deformaciones.

Otra de las características de la fibrina es la lisabilidad, correspondiente al tiempo de disolución del polímero ante condiciones controladas. Puede evaluarse por un método densitométrico cinético (registrando la densidad óptica en función del tiempo y determinando el tiempo de lisis) (34) o por un sistema de perfusión (percolando activadores de plasminógeno y cuantificando productos líticos, como dímero D y productos de degradación de la fibrina, en el eluyente) (35).

ARQUITECTURA DE LA FIBRINA

Existen numerosos factores que influyen en las características de la red de fibrina, principalmente la concentración y calidad del Fbg, la fuerza iónica del medio, la concentración de iones calcio, la concentración de trombina y algunos estados patológicos como diabetes, síndrome nefrótico y otros.

La concentración de fibrinógeno en plasma normal fluctúa en un estrecho rango (2 a 4 g/L); no obstante, estas pequeñas variaciones modifican la estructura de la fibrina. Al aumentar la concentración de Fbg, la fibrina resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de lisar (Fig. 10) (27). La situación *in vivo* es más compleja aún, ya que

la concentración de Fbg en el entorno de la fibrinoformación es muy diferente a la que se encuentra en circulación.

Variaciones en la estructura del Fbg, incluso sus variantes naturales, pueden producir cambios pronunciados en la fibrina resultante. El Fbg de bajo PM carece de la secuencia aminoacídica (RGD en A α 572-574) que interactúa con células endoteliales, plasminógeno y F XIII generando fibrina que difiere en varias de sus propiedades. Recientemente se ha demostrado que las variantes del Fbg de alto y bajo PM modulan la capacidad angiogénica de células endoteliales en matrices de fibrina (Fig. 11) (36). Respecto al Fbg de bajo PM, el Fbg de alto PM origina fibrina más abierta y favorece el crecimiento de estructuras capilares de células de microvasculatura. Otra variante del Fbg (Fbg 1 y 2), que difieren en el contenido de las cadenas γ y γ' , generan fibrinas de diferente estructura (Fig. 12) (37).

La molécula de Fbg puede presentar anomalías que alteran su funcionalidad provocando desórdenes de la coagulación. Estas patologías denominadas disfibrinogenemias pueden ser congénitas o adquiridas y generalmente conducen a redes de fibrina con alteraciones estructurales y/o funcionales. Los estudios de las disfibrinogenemias (38-40) han permitido explicar la relación estructura-función de los distintos aminoácidos del Fbg, es decir, cómo influye la presencia de un aminoácido en la fibrina resultante. Las alteraciones genéticas pueden incluir mutaciones puntua-

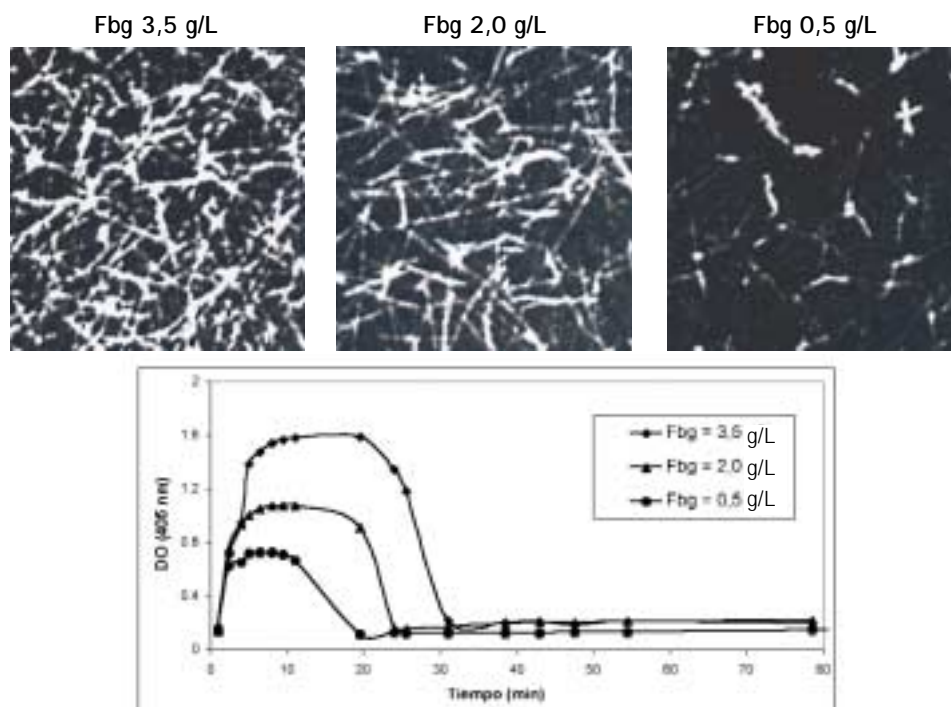


Figura 10. Efecto de la concentración de Fbg sobre la estructura de la fibrina y la cinética de fibrinoformación. Las imágenes de la fibrina fueron obtenidas por microscopía confocal. Tomado de *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110 (27).

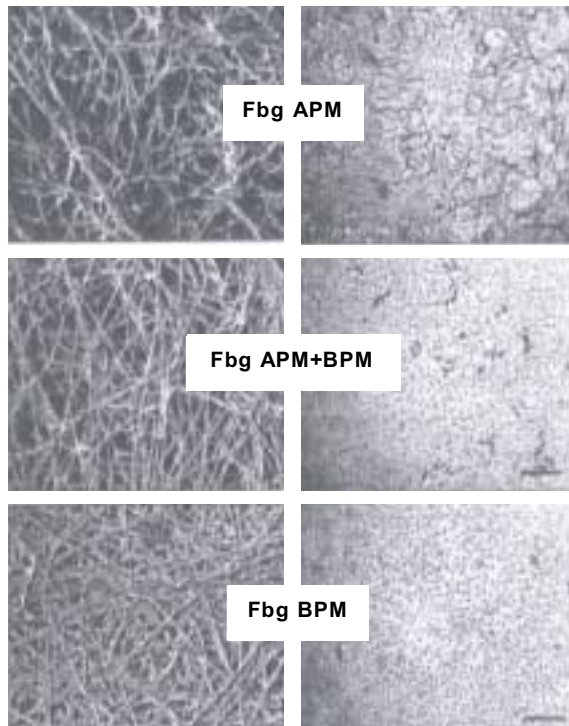


Figura 11. La primera columna corresponde a imágenes por MEB de redes de fibrina obtenidas a partir de Fbg de alto peso molecular (Fbg APM), bajo peso molecular (BPM) y la mezcla de ambos. La segunda columna muestra el efecto de las mismas variantes de fibrina sobre la formación de estructuras capilares de células endoteliales de microvasculatura (HMVEC). Tomado de *J Thromb Haemost* 2006; 4(9): 1975-81 (36).

les, deleciones o extensiones de alguna cadena, que modifiquen la formación de puentes disulfuro o la acción de enzimas que actúan directamente sobre el Fbg, como trombina, plasmina o F XIIIa. El 40% de las disfibrinogenemias congénitas detectadas no se asocian con alteraciones clínicas, mientras que el resto puede manifestarse por trastornos hemorrágicos, trombóticos, a veces ambos en el mismo paciente, abortos espontáneos o cicatrización defectuosa (23).

Recientemente (41) se ha propuesto una clasificación de las diferentes estructuras de las redes de fibrina en base a 38 disfibrinogenemias hereditarias, resultando cinco grupos (Fig. 13): 1) redes normales o con estructura semejante a la normal; 2) redes con una estructura menos ordenada, con importante cantidad de nudos o poros; 3) redes porosas, clase A; 4) redes porosas clase B que originan fibrinas altamente ramificadas, con grandes poros, formadas por fibras delgadas y muy frágiles ante el esfuerzo mecánico. 5) redes muy ramificadas sin grandes poros, muy frágiles ante el esfuerzo mecánico. Los autores observaron que las disfibrinogenemias con defecto en la liberación de fibrinopéptido A o en los sitios de unión D-E dieron origen a redes normales o de estructura menos ordenada,

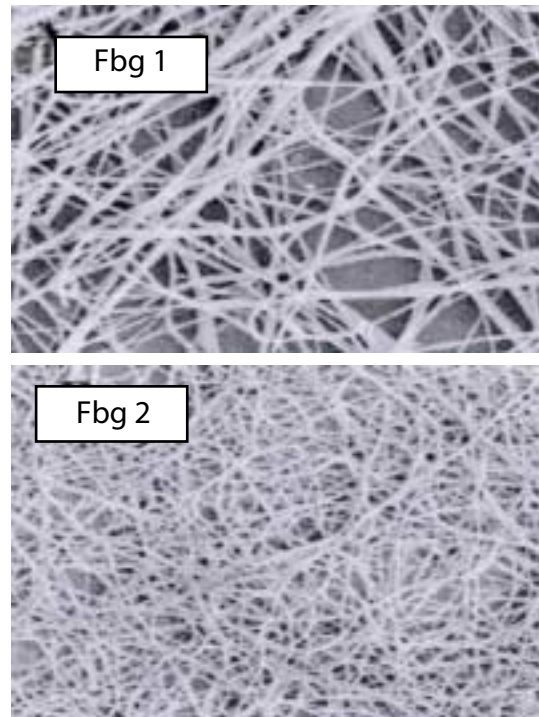


Figura 12. Imágenes de MEB de redes de fibrina obtenidas a partir de Fbg 1 y 2 purificados. Tomado de *Blood* 2005 Oct15; 106(8): 2730-6 (37).

mientras que aquellas con defecto en la asociación D:D generaron fibrina porosa (grupo 3), compuesta por muchas fibras que se interrumpían abruptamente. Se concluyó que los principales desórdenes que originan redes porosas son alteraciones en la asociación D:D, en la asociación lateral, glicosilación extra o defecto en la unión a calcio. Entre las principales alteraciones del Fbg se incluyen sustituciones de la arginina 275 por diferentes aminoácidos. Resulta sorprendente que la sustitución de un solo aminoácido provoque alteraciones de la estructura de la fibrina tan pronunciadas (Fig. 13, grupo 3).

El aumento de la fuerza iónica produce fibrina de estructura más ramificada y compacta, de mayor turbidez y rigidez, de porosidad marcadamente disminuida que la fibrina obtenida a menor fuerza iónica (42) (43).

Los cationes divalentes tienen una importancia relevante en la estructura de la fibrina obtenida a partir de Fbg purificado (44). En concentraciones fisiológicas, los tres sitios de unión a calcio de alta afinidad del Fbg, uno en el subdominio C de la cadena γ (γ C) y dos en el dominio C de la cadena β (β C), están ocupados (45), mientras los sitios de unión de baja afinidad (como los residuos del ácido siálico) tienen función reguladora (46). El calcio mantiene la estructura y estabilidad del Fbg. Además, aumenta el grosor de las fibras, la rigidez y resistencia mecánica de los geles de fibrina (47).

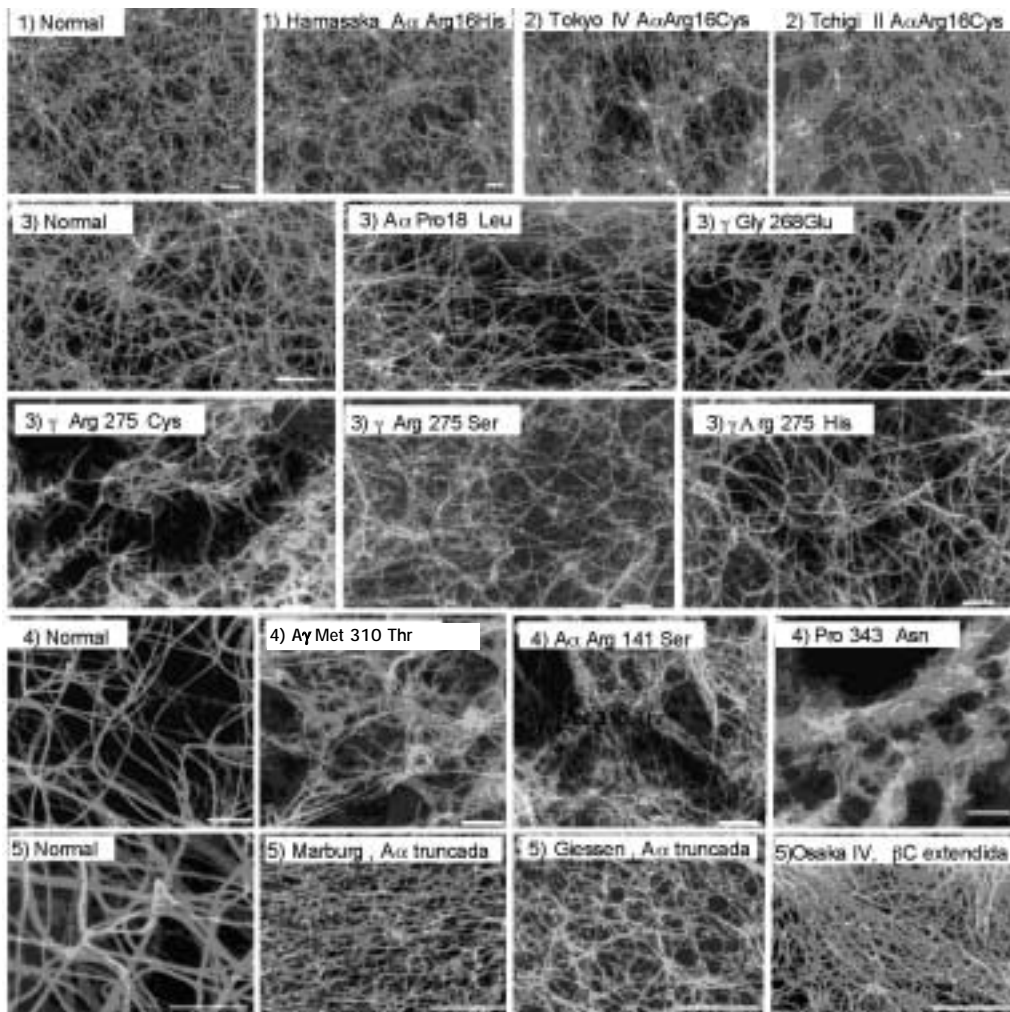


Figura 13. Clasificación de las estructuras de las redes de fibrina en base a las disfibrinogenemias hereditarias. 1) Redes de estructura Normal. 2) Redes con estructura menos ordenada, con poros y nudos 3) Redes porosas grupo A. 4) Redes porosas grupo B. 5) Redes entramadas. En cada imagen figura el N° del grupo y el origen de la muestra. Barras = 1 μ m. Tomado de *J Thromb Haemost* 2006; 4 (8): 1738-46 (41).

La concentración de trombina ejerce un efecto complejo sobre la fibrina. Blömbäck y col. estudiaron fibrina plasmática (48) y la obtenida en sistemas purificados (Fig. 14) (27). En ambos sistemas, al aumentar la concentración de trombina, las redes de fibrina comienzan amplificando su ramificación y densidad de fibras, mientras disminuye su porosidad. Pero a concentraciones mayores aún, se produce el efecto contrario. Además, está reportado que concentraciones de trombina crecientes (de 0,05 a 2 U/mL) generan fibras de menor diámetro. Las mayores variaciones *in vivo* se producen en la concentración de trombina, debido a los mecanismos fisiológicos complejos que controlan y regulan su actividad.

Si bien la actividad del F XIIIa no modifica la estructura de la fibrina, influye drásticamente en sus propiedades, principalmente en las viscoelásticas, la permeabilidad y su susceptibilidad a la lisis. Se ha reportado que los coágulos entrecruzados presentaron valores de

G' cinco veces mayores que en los no entrecruzados, indicando un pronunciado aumento de su dureza (49).

Las redes de fibrina se modifican, además, en una serie de estados patológicos. La glucosa *in vitro* aumenta el grosor de las fibras, disminuyendo la permeabilidad, tanto *in vitro* (50) como *in vivo* (51). En casos de cirrosis, el contenido elevado de ácido siálico produce polimerización defectuosa del Fbg (52). En el síndrome nefrótico se observan fibrinas compactas y rígidas, resistentes a la lisis (53).

INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA DE LA FIBRINA EN SU LISABILIDAD

La velocidad de fibrinolisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina (54). La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que dentro del

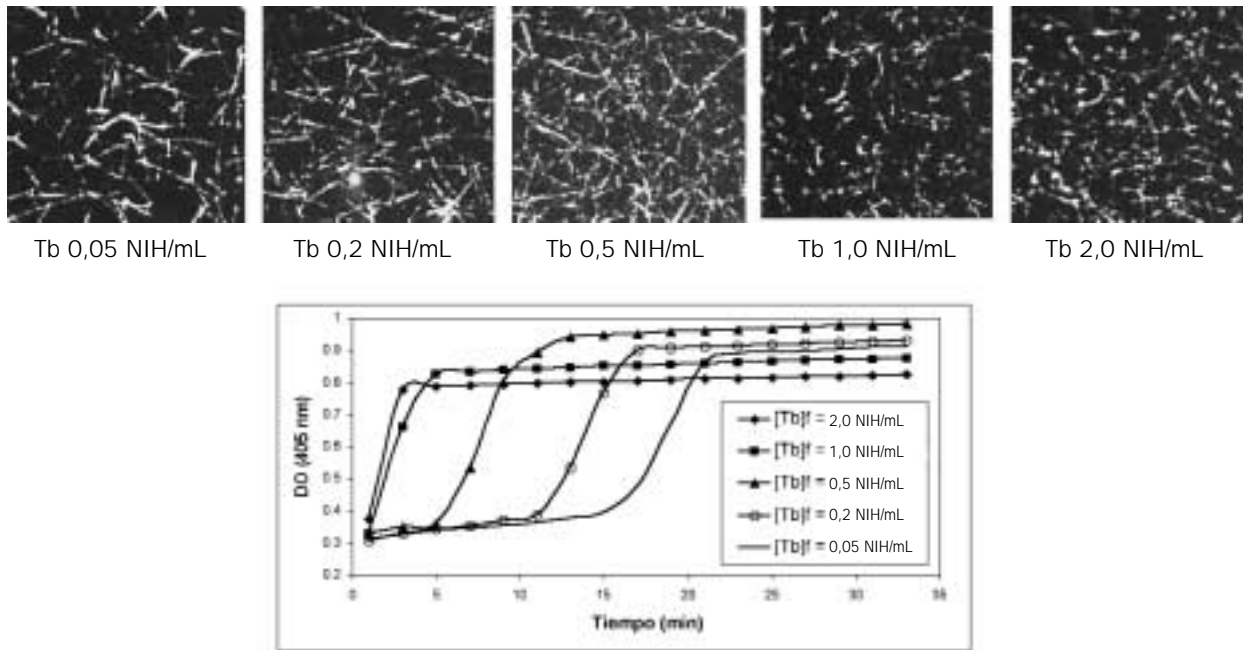


Figura 14. Efecto de la concentración de trombina sobre la estructura de la fibrina (imágenes por microscopía confocal) y la cinética de fibrinoformación. Tomado de *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110 (27).

mismo gel, fibras delgadas se lisan antes que las gruesas (55). Redes de estructura abiertas se lisan más rápidamente que las compactas a causa de la reducida cantidad de fibras por unidad de volumen y la movilidad facilitada de componentes fibrinolíticos (56).

La activación de plasminógeno (Plg) por t-PA aumenta 1.000 veces en presencia de fibrina. Además de los presentados, en el Fbg existen sitios de unión para estas proteínas (Fig. 15: región γ 312-324 que une t-PA y α 148-160 que une Plg) (23). Estos sitios crípticos están ocultos en el Fbg y por cambios conformacionales posteriores a la fibrinoformación, se exponen en la fibrina quedando convenientemente ubicados para favorecer la activación del Plg. Esto es fisiológicamente relevante ya que circunscribe la actividad fibrinolítica al lugar necesario: donde se encuentra el coágulo sanguíneo. La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg también depende de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor (57).

La permeabilidad de la fibrina es un factor decisivo en la velocidad de fibrinólisis. El transporte de plasminógeno y sus activadores por permeación a través del coágulo, aumentó la velocidad de lisis aproximadamente 100 veces comparado con el transporte por difusión (58). Además, se reportó un marcado aumento de la fibrinólisis (más de 10 veces) al incrementar la velocidad de permeación de los mediadores fibrinolíticos dentro de los geles de fibrina. No se vieron diferencias entre la lisis de geles gruesos y finos cuando se utilizaron altas concentraciones de plasmina o u-PA en el flujo a través de los geles (59).

ALTERACIONES DE LA FIBRINA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Hay numerosos trabajos que vinculan las alteraciones de la fibrina y su lisabilidad para explicar los mecanismos de diferentes patologías, principalmente en casos particulares de trombosis, como enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, etc. Se compararon las características de la fibrina de 100 jóvenes con enfermedad coronaria arterial prematura *versus* 100 controles con niveles hemostáticos semejantes (60). La fibrina de estos pacientes comenzó a polimerizar antes que la de los controles [Fase lag de la fibrinoformación: 39 (37-41) *vs.* 47 (44-50) segundos, $p < 0,001$], mostraron una estructura densa menos permeable [$K_s \cdot 10^9 \text{ cm}^2 = 12,2$ (11,1-13,3) *vs.* 15,2 (14,0- 16,5), $p < 0,001$], formada por fibras más gruesas [$\mu \cdot (10^{13} \text{ Da/cm}) = 8,5$ (7,7-9,2) *vs.* 9,7 (8,9-10,5), $p < 0,05$].

Por otra parte, la fibrina de 38 pacientes menores de 45 años con infarto de miocardio resultó más compacta, menos permeable [$K_s \cdot (10^9 \text{ cm}^2) = 8,3 \pm 5,2$ *vs.* $12,5 \pm 5,7$, $p < 0,001$], con fibras más gruesas [$\mu \cdot 10^{13} \text{ Da/cm} = 13,1 \pm 7,7$ *vs.* $16,6 \pm 7,5$, $p < 0,01$]. La función fibrinolítica deteriorada de estos pacientes fue asociada al aumento de la actividad plasmática de PAI-1 y a la estructura anormal de la fibrina (61).

Los alelos Val 34 del F XIII y α 312 Ala del Fbg están asociados a riesgo aterotrombótico, aunque estas relaciones no han sido explicadas por estudios clínicos y de laboratorio. Se relacionaron interacciones entre la estructura y función de la fibrina con polimorfismos de Fbg (α Thr 312 Ala) y F XIII (Val 34 Leu) además

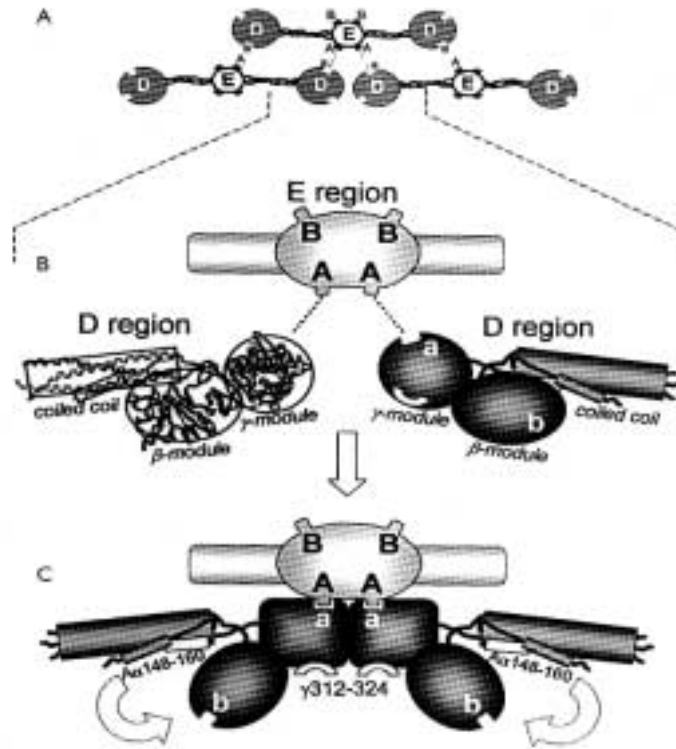


Figura 15. Representación esquemática de la exposición de sitios críticos en las microfibras. Tomado de *J Thromb Haemost* 2003; 89: 409-419 (23).

de otros factores de riesgo cardiovascular, en 125 pacientes con accidente cerebrovascular (62). Se ha obtenido fibrina más compacta y menos permeable relacionada a la presencia de estos alelos que podrían explicar las asociaciones encontradas con el riesgo trombotico.

En este laboratorio se estudió el efecto de altas concentraciones de homocisteína (Hcy) sobre distintas propiedades de la fibrina. El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica demostraron que la Hcy produjo redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control (28). Los geles de fibrina provenientes de fibrinógeno incubado con Hcy, fueron más resistentes a la deformación por fuerza centrífuga.

Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). Sin embargo, el aminoácido no modificó la actividad biológica de plasmina, plasminógeno, ni de sus activadores. Por lo tanto, la lisis dificultada estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos evaluados (63).

En síntesis, más allá de los detalles moleculares, la fibrina no es igual en cualquier circunstancia: puede variar por diferentes condiciones fisiológicas o esta-

dos patológicos. Conocer los factores y mecanismos que influyen en la red de fibrina y su lisis ayudaría a comprender aquellas situaciones fisiopatológicas que producen una mayor o menor resistencia a la acción fibrinolítica fisiológica o inducida por fármacos, especialmente las no explicadas por estudios clínicos o de laboratorio.

CORRESPONDENCIA

DRA. ANA MARÍA LAURICELLA
Int. Güiraldes 2160
Pabellón II. Piso 4. Ciudad Universitaria
C1428EHA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES,
Argentina.
Teléfono-FAX: 54-11- 4576 3342
E-mail: lht@qb.fcen.uba.ar

Referencias bibliográficas

1. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization and functions. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10 Suppl 1: S45-8.
2. Erickson HP, Fowler WE. Electron microscopy of fibrinogen, its plasminic fragments and polymers. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408: 146-63.

3. Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E, Cohen C. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* 1985; 230: 1388-91.
4. Fu Y, Grieninger G. Fib420: A normal human variant of fibrinogen with two extended chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2625.
5. Nieuwenhuizen W. Biochemistry and measurement of fibrinogen. *Eur Heart J* 1995; 16: 6-10.
6. Spraggon G, Applegate D, Everse SJ, Zhang JZ, Verapandian L, Redman C *et al.* Crystal structure of a recombinant alphaEC domain from human fibrinogen-420. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(16): 9099-104.
7. Mosesson MW. Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (2): 231-8.
8. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (γ). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5069-73.
9. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing γ' chain. *Biochemistry* 1996; 35: 10448-53.
10. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Wall JS, Hainfeld JF. Fibrinogen assembly and crosslinking on a fibrin fragment E template. *Thromb Haemost* 2002; 87 (4): 651-8.
11. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (8): 1894-904.
12. Kaminski M, Siebenlist KR, Mosesson MW. Evidence for thrombin enhancement of fibrin polymerization that is independent of its catalytic activity. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 218-25.
13. Lorand L. Factor XIII: Structure, activation and interaction with fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 291-311.
14. Tsurupa G, Medved L. Identification and characterization of novel t-PA and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. *Biochemistry* 2001; 40: 801-8.
15. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10729-32.
16. Dejana E, Zanetti A, Conforti LG. Biochemical and functional characteristics of fibrinogen interaction with endothelial cells. *Haemostasis* 1988; 18: 262-70.
17. Pereira M, Rybarczyk BJ, Odrjijn TM, Hocking DC, Sottile J, Simpson-Haidaris PJ. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci* 2002; 115 (Pt 3): 609-17.
18. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 11-30.
19. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 247-99.
20. Sahni A, Khorana AA, Baggs RB, Peng H, Francis CW. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. *Blood* 2006; 107 (1): 126-31.
21. Shiose S, Hata Y, Noda Y, Sassa Y, Takeda A, Yoshikawa H, *et al.* Fibrinogen stimulates in vitro angiogenesis by choroidal endothelial cells via autocrine VEGF. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242 (9): 777-83.
22. Sahni A, Sahni SK, Francis CW. Endothelial cell activation by IL-1beta in the presence of fibrinogen requires alpha ν beta3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (10): 2222-7.
23. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89: 409-19.
24. Hettasch JM, Greenberg CS. Fibrin formation and stabilization. In: *Thrombosis and Hemorrhage*. 2^o ed. Baltimore (Maryland, EUA): Lozcalzo J and Schafer AI Eds.; 1998. p. 129-154.
25. Gorkun OV, Veklich YI, Medved LV, Henschen AH, Weisel JW. Role of the α C domains of fibrin in clot formation. *Biochemistry* 1994; 33: 6986-97.
26. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (Factor XIII) mediated cross-linking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1221-8.
27. Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3 D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110.
28. Lauricella AM, Quintana I, Kordich L. Effect of homocysteine thiol group on fibrin networks: Another possible mechanism of harm. *Thromb Res* 2002; 107: 75-9.
29. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, *et al.* Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-61.
30. Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 1999; 82 (2): 277-82.
31. Lukacova D, Matsueda GR, Haber E, Reed GL. Inhibition of factor XIII activation by an anti-peptide monoclonal antibody. *Biochemistry* 1991; 30 (42): 10164-70.
32. Mosesson MW, Hernandez I, Siebenlist KR. Evidence that catalytically-inactivated thrombin forms non-covalently linked dimers that bridge between fibrin/fibrinogen fibers and enhance fibrin polymerization. *Biophys Chem* 2004; 110 (1-2): 93-100.
33. Scheiner T, Jirouskova M, Nagaswami C, Collier BS, Weisel JW. A monoclonal antibody to the fibrinogen gamma-chain alters fibrin clot structure and its properties by producing short, thin fibers arranged in bundles. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (12): 2594-602.
34. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. A novel plasma proteinase α 2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* 2004; 103 (10): 3783-8.
35. Vaziri ND, Kennedy SC, Kennedy M, Gonzalez E. Coagulation, fibrinolytic, and inhibitory proteins in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Am J Med* 1994; 96 (6): 571.

36. Kaijzel EL, Koolwijk P, van Erck MG, van Hinsbergh VW, de Maat MP. Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix *in vitro* and *in vivo*. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (9): 1975-81.
37. Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, Bush LA, Di Cera E, Shainoff JR, *et al*. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing gamma' chains. *Blood* 2005; 106 (8): 2730-6.
38. Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Itoh T, Kitamura N, Nishinarita S, *et al*. Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of gammaAla327Thr: formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. *Blood* 2004; 103 (8): 3045-50.
39. Marchi R, Carvajal Z, Meyer M, Soria J, Ruiz-Saez A, Arocha-Pinango CL, *et al*. Fibrinogen Guarenas, an abnormal fibrinogen with an Aalpha-chain truncation due to a nonsense mutation at Aalpha 467 Glu (GAA)—>stop (TAA). *Thromb Res* 2006; 118 (5): 637-50.
40. Hessel B, Silveira AM, Carlsson K, Oksa H, Rasi V, Vahtera E. Fibrinogenemia Tampere. A dysfibrinogenemia with defective gelation and thromboembolic disease. *Thromb Res* 1995; 78 (4): 323-39.
41. Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, *et al*. A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (8): 1738-46.
42. Blombäck B, Banerjee D, Carlsson K, Hamsten A, Hessel B, Procyk R, Silveira A, *et al*. Native fibrin gel networks and factors influencing their formation in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 1990; 281: 1-23.
43. Okada M, Blombäck B. Calcium and fibrin gel structure. *Thromb Res* 1983; 29: 69-280.
44. Marx G. Divalent cations induce protofibril gelation. *Am J Hemat* 1988; 27: 104-9.
45. Kostelansky MS, Betts L, Gorkun OV, Lord ST. 2.8 Å crystal structures of recombinant fragment D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the "b" site disrupts its nearby calcium-binding site. *Biochemistry* 2002; 41: 12124-32.
46. Dang CV, Shin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium binding sites that influence fibrin assembly. *J Biol Chem* 1989; 264(25): 15104-8.
47. Hardy JJ, Carrell NA, McDonagh J. Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408: 279-87.
48. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. Fibrin in human plasma: gel architecture governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res* 1994; 75: 521-38.
49. Ryan EA, Mochros LF, Weisel JW, Lorand L. Structural origin of fibrin clot rheology. *Biophys J* 1999; 77: 2813-26.
50. Nair CH, Azhar A, Wilson JD, Dhall DP. Studies of fibrin network structure in human plasma. Part II. Clinical application: Diabetic and antidiabetic drug. *Thromb Res* 1991; 64: 477-85.
51. Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hessel B, Johnsson H, *et al*. Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetología* 1996; 39: 1519-23.
52. Martinez J, MacDonald KA, Palascak JE. The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with leaver disease: distribution of sialic acid on the constituent chains. *Blood* 1983; 61: 1196-202.
53. Yoshida Y, Shiiki H, Iwano M, Uyama H, Hamano K, Nishino T, *et al*. Enhanced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with nephrotic syndrome. *Nephron* 2001; 88 (1): 24-9.
54. Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 1999; 82 (2): 277-82.
55. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, *et al*. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-61.
56. Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 610-21.
57. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 1992; 267: 24259-63.
58. Sabovic M, Blinc A. Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. *Eur J Physiol* 2000; 440 [Suppl]: R134-6.
59. Wu JH, Siddiqui K, Diamond S. Transport phenomena and clot dissolving therapy: an experimental investigation of diffusion-controlled and permeation-enhanced fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1994; 72 (1): 105-12.
60. Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106 (15): 1938-42.
61. Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blomback M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost* 1996; 76 (4): 535-40.
62. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003; 361 (9367): 1424-31. Erratum in: *Lancet* 2003; 361 (9376): 2250.
63. Lauricella AM, Quintana IL, Sasseti B, Castañón MM, Kordich LC. Influence of homocysteine on fibrin network lysis. *Blood Coagul Fibrinol* 2006; 17: 181-6.

Aceptado para su publicación el 26 de marzo de 2007