

## Tesis Doctoral

# Efectos de la homocisteína sobre la estructura y lisis de la fibrina

Lauricella, Ana María

2005

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Lauricella, Ana María. (2005). Efectos de la homocisteína sobre la estructura y lisis de la fibrina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3822\\_Lauricella](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3822_Lauricella)

**Cita tipo Chicago:**

Lauricella, Ana María. "Efectos de la homocisteína sobre la estructura y lisis de la fibrina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2005.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3822\\_Lauricella](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3822_Lauricella)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**FCE y N BIBLIOTECA**



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

***“Efectos de la Homocisteína  
sobre la Estructura y Lisis de la Fibrina”***

Autora:

**Lic. Ana María Lauricella**

Directora:

**Dra. Lucía C. Kordich**

Directora Asistente: **Dra. Marta I. Mariano**

**Laboratorio de Hemostasia y Trombosis  
Área Análisis Biológicos. Departamento de Química Biológica.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires.**

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**- 2005 -**

**3822**

Desde expresar el amor en la  
etapa y que de día en día  
una enorme dosis de amor  
en especial a  
dedicación  
trato y respeto  
más de vida

A la Dra. Irene...

A lo Lic. ...  
personal. A la Dra. ...  
Valencia, por su compa...

A Dra. ...  
especialmente en ...

***El saber es un castillo pacientemente construido con granos de arena  
escrupulosamente tallados.***

***A mis hijos***

A Gabriel R...  
tecnologías

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a todas las personas que me han acompañado en esta etapa y que de distintas formas me han apoyado, brindándome estímulo, afecto y una enorme dosis de consideración.

En especial a mi directora, Dra. Lucía Kordich, por su presencia y permanente dedicación. Sin proponérselo, en lo profesional es para mí un ejemplo de trabajo y respeto por el paciente, mientras que en el aspecto humano es un ejemplo de vida.

A la Dra Irene Quintana por considerarla un valioso referente en esta línea de investigación, pero principalmente por su sincera amistad.

A la Lic. Mercedes Castañón, por las jugosas discusiones en lo laboral y personal. A la Dra. Beatriz Sasseti, por su apoyo y colaboración. A Cecilia y Valeria, por su compañerismo.

A Dra. Cristina Duboscq, por su amistad y desinteresada ayuda, especialmente en mis comienzos en Hemostasia.

A la Dra. Alcira Nesse, por haber sido un pilar durante los primeros años de mi formación.

A Vanina, Vicky y María Julia, que han compartido mi tarea.

A la Dra, Marisa Vizcargüénaga, por su afectuoso estímulo y reconocimiento.

A la Dra Marta Mariano y al Dr, Juan Pablo Bossini, que me han guiado cordialmente en el fascinante mundo de la microscopía.

A la Dra Ana María Rojas, el Dr. Horacio Corti y el Dr. Luis Barrera por su importante colaboración en los trabajos físico-químicos.

A Gabriel Rosa (alias Mc Gyver) por su desinteresada ayuda ante las dificultades tecnológicas.

A mis compañeros de Análisis Biológicos en especial a las Dras. Emi Steyerthal, Glaciela Garbossa y Gladys Pérez, por su aliento y paciencia.

Al personal de Diagnolab, por su asistencia y buena disposición.

A Miguel y Nahuel que han compartido todos estos años de esfuerzo y que me han ayudado tanto con los dibujos y la computadora. Y un agradecimiento especial a Ailín, que me rodeó de alegría en momentos difíciles.

A Dios y a todos ellos, Muchas Gracias por estar.

# EFFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE LA ESTRUCTURA Y LISIS DE LA FIBRINA

## **RESUMEN**

Actualmente, los niveles elevados de homocisteína (Hcy) constituyen un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva, en particular para la trombosis. Sin embargo, los mecanismos involucrados no han sido esclarecidos.

Los objetivos de esta tesis fueron:

- Estudiar el efecto de la Hcy sobre distintas propiedades de la fibrina, evaluando: la cinética de formación, estructura, viscoelasticidad, compactación, permeabilidad y lisabilidad.
- Evaluar el efecto de la Hcy sobre el proceso fibrinolítico y sus componentes.

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.

Los tromboelastogramas realizados con sangre entera incubada con Hcy mostraron incremento de la velocidad de formación de fibrina. Se obtuvieron coágulos más rígidos, dosis dependiente de la concentración de Hcy.

Los ensayos reométricos mostraron que el componente fluido resultó más viscoso y compartimentalizado en una estructura sólida más entrecruzada, dando lugar a un gel más rígido y menos deformable.

Los geles de fibrina provenientes de fibrinógeno incubado con Hcy, fueron más resistentes a la deformación por fuerza centrífuga.

La permeabilidad de geles de fibrina plasmática disminuyó al aumentar la concentración de Hcy. El aminoácido generó cambios en el fibrinógeno y el factor XIII, responsables del descenso de permeabilidad de la fibrina.

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.

Los hallazgos enunciados constituyen un nuevo aporte al conocimiento de los mecanismos nocivos asociados a la hiperhomocisteinemia.

**Palabras claves:** Homocisteína, trombosis, redes de fibrina, estructura, fibrinolisis.

## **EFFECTS OF HOMOCYSTEINE ON FIBRIN STRUCTURE AND LYSIS**

### ***ABSTRACT***

It has been established that high levels of homocysteine (Hcy), is an independent risk factor for vascular occlusive disease such as thrombosis. However, the pathophysiologic mechanisms involved in the deleterious effects of Hcy are still unclear.

The objectives of this thesis were:

- To study Hcy effects on different fibrin properties: fibrin formation kinetic, structure, viscoelasticity, permeability and lysis.
- To evaluate Hcy effects on fibrinolytic process and components involved.

Quantitative analysis of scanning electronic microscopy has shown that homocysteine-associated networks were different from control, with shorter, thicker and more branched fibers, resulting in a more compact structure.

Thrombelastograms performed with citrated blood incubated with Hcy showed increased velocity of clot formation. The augmentation of clot rigidity was strongly correlated with Hcy concentration.

The rheometric results indicated that Hcy induced an increase in the cross-linking of the fibrin fibers, rendered in a more rigid clot than control.

It has been proved that fibrinogen incubated with Hcy induced fibrin gels more resistant to be deformed by centrifugal force.

Plasmatic clots formed in the presence of Hcy have demonstrated a marked decrease in permeation, related to changes on fibrinogen and factor XIII.

The lysis time of Hcy-related fibrin networks was longer when urokinase type plasminogen activator (u-PA) was used. However, Hcy did not modify biological activities of plasmin, plasminogen and the evaluated activators. Therefore, defective fibrinolysis with u-PA was associated to Hcy-fibrin structural alterations rather than to effects on the fibrinolytic components.

We consider that our findings contribute to understand the mechanisms involved in the homocysteine harmful effect.

### **Key words**

Homocysteine, thrombosis, fibrin networks, structure, fibrinolysis.

***ÍNDICE***



## **INTRODUCCIÓN**

<i>Homocisteína y enfermedad vascular</i>	11
<b>Homocisteinemia</b>	11
<i>Evidencias clínicas asociadas con hiperhomocisteinemia</i>	14
<i>Sistema de coagulación</i>	16
<b>Mecanismo regulatorio</b>	19
<b>Molécula de fibrinógeno</b>	23
<b>Trombina</b>	28
<b>La red de fibrina</b>	30
<b>Factor XIII</b>	34
<b>La arquitectura de la fibrina</b>	38
<i>El sistema plasminógeno-plasmina</i>	41
<b>Plasmina</b>	41
<b>Plasminógeno</b>	46
<b>Activadores del plasminógeno</b>	49
<b>Activador tisular del plasminógeno</b>	49
<b>Activador del plasminógeno tipo uroquinasa</b>	54
<b>Agentes trombolíticos</b>	55
<b>Inhibidores del sistema fibrinolítico</b>	55
<b>Fisiología de la lisis del coágulo</b>	58
<b>Fibrina como cofactor de la actividad lítica</b>	61
<b>Mecanismos aterotrombóticos de la homocisteína</b>	64

<b>OBJETIVOS</b>	68
------------------	----

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	69
-----------------------------	----

<b>Drogas y reactivos químicos</b>	69
<b>Cuantificación de trombina</b>	70
<b>Tiempo de trombina</b>	70
<b>Tiempo de Reptilasa</b>	71
<b>Cuantificación de fibrinógeno</b>	71
<b>Purificación de plasminógeno</b>	71
<b>Identificación del plasminógeno por electroforesis</b>	72
<b>Cuantificación de plasminógeno</b>	73
<b>Fibriformación</b>	74
<b>Selección de condiciones experimentales</b>	75
<b>Microscopía electrónica</b>	77

<b>Tromboelastograma</b>	<b>78</b>
<b>Reometría</b>	<b>84</b>
<b>Compactación</b>	<b>90</b>
<b>Permeabilidad</b>	<b>92</b>
<b>Sistema plasminógeno-plasmina</b>	<b>99</b>
<b>Determinación de la actividad de plasmina</b>	<b>99</b>
<b>Estudio de la activación de plasminógeno</b>	<b>100</b>
<b>Evaluación de la coagulación y fibrinólisis en una etapa</b>	<b>102</b>
<b>Selección de condiciones experimentales</b>	<b>104</b>
<b>Formación y lisis de fibrina plasmática</b>	<b>108</b>
<b>Evaluación de la fibrinólisis en un sistema en dos etapas</b>	<b>112</b>
<b><i>RESULTADOS</i></b>	<b>116</b>
<b>Fibriformación</b>	<b>116</b>
<b>Microscopía electrónica</b>	<b>119</b>
<b>Tromboelastograma</b>	<b>123</b>
<b>Reometría</b>	<b>131</b>
<b>Compactación</b>	<b>140</b>
<b>Permeabilidad</b>	<b>145</b>
<b>Ensayos cromogénicos</b>	<b>158</b>
<b>Determinación de la actividad de plasmina</b>	<b>158</b>
<b>Estudio de la activación de plasminógeno</b>	<b>161</b>
<b>Evaluación de la coagulación y fibrinólisis en una etapa</b>	<b>164</b>
<b>Evaluación de la coagulación y fibrinólisis en dos etapas</b>	<b>165</b>
<b>Efecto de la homocisteína sobre la lisis de redes plasmáticas iguales</b>	<b>167</b>
<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>172</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>177</b>
<b><i>ABREVIATURAS</i></b>	<b>191</b>
<b><i>DIFUSIÓN DE RESULTADOS</i></b>	<b>193</b>

## ***INTRODUCCIÓN***

## HOMOCISTEÍNA Y ENFERMEDAD VASCULAR

La relación entre niveles plasmáticos elevados de homocisteína (Hcy) y la enfermedad vascular aterosclerótica, se inicia en 1969, a partir de observaciones realizadas por Kilmer Mc Cully sobre pacientes con homocistinuria <sup>1</sup>. La asociación entre hiperhomocisteinemia moderada y la enfermedad arterial coronaria fue reportada por primera vez por D. Wilcken, en 1976 <sup>2</sup>. En la última década se ha demostrado que la hiperhomocisteinemia (HHcy), aún en niveles leves y moderados (15-100  $\mu\text{M}$ ) está asociada a enfermedades vasculares <sup>3-4</sup>, alteraciones neuropsiquiátricas <sup>5-6</sup>, complicaciones obstétricas <sup>7-8</sup> y a efectos teratogénicos <sup>9</sup>.

Numerosos estudios epidemiológicos postulan que niveles plasmáticos elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando al sistema vascular coronario, cerebral y periférico <sup>10-11</sup>.

### **HOMOCISTEINEMIA**

La Hcy es un aminoácido de 4 átomos de carbono que contiene un grupo sulfhidrilo en su molécula. Este aminoácido no es constituyente natural de proteínas sino que es un producto intermedio en el metabolismo de la metionina, fuente principal de radicales metilos en los mamíferos.

La Hcy puede generar compuestos disulfuro con moléculas que contienen grupos tioles, como cisteína, glutatión o proteínas que contengan el sulfhidrilo del residuo cisteína libre. En particular, pueden reaccionar dos moléculas de Hcy para formar el homodímero llamado homocistina. Puede intervenir, además, en reacciones de intercambio con otros compuestos azufrados que forman uniones disulfuro.

En circulación, alrededor del 80 % de la Hcy total está unida a proteínas, principalmente a la albúmina, el 1 % está presente como Hcy reducida y el resto se encuentra formando los dímeros o el éster cíclico tiolactona.

Si bien no hay acuerdo internacional para establecer el límite superior de homocisteinemia en individuos sanos, con niveles vitamínicos óptimos, distintos autores han propuesto concentraciones semejantes: Ubbink *et al*<sup>12</sup> 11,7  $\mu\text{M}$ , Rasmussen *et al*<sup>13</sup> 11,9  $\mu\text{M}$ , mientras Quintana<sup>14</sup> propone 12  $\mu\text{M}$ .

Los niveles plasmáticos de Hcy dependen de una serie de factores individuales. Aumentan con la edad<sup>15</sup>, especialmente después de los 65 años, debido a la disminución de la absorción intestinal de vitaminas y de la función renal que regula su excreción.

Los valores medios de Hcy son mayores en hombres que en mujeres hasta la menopausia, en que se igualan los niveles<sup>16,17</sup>.

Los niveles plasmáticos y urinarios de Hcy pueden incrementarse a causa de factores genéticos, especialmente debido a alteraciones moleculares de enzimas que intervienen en el metabolismo del aminoácido. Las principales enzimas cuyas alteraciones están asociadas a hiperhomocisteinemia son la cistationín  $\beta$ -sintetasa (*C $\beta$ S*) y la metiléntetrahydrofolato reductasa (*MTHFR*). Se conocen más de 90 mutaciones en el gen de la *C $\beta$ S* asociadas a homocistinuria: enfermedad autosómica recesiva que cursa con niveles muy elevados de Hcy en plasma (>400  $\mu\text{M}$ ) y en orina. La prevalencia de estas alteraciones genéticas es muy baja. Individuos heterocigotas pueden presentar valores de Hcy levemente elevados e incluso normales, y sólo muestran alterada la prueba de sobrecarga de metionina. Por otra parte, la variante termolábil de la *MTHFR* es causada por la sustitución nucleotídica C677T en el gen que codifica esta enzima. La prevalencia de este polimorfismo es muy elevada. En la Argentina es de 15,8 % para los portadores homocigotas y 42,8 % para los heterocigotas<sup>18</sup>. Los individuos homocigotas para esta mutación mostrarían una hiperhomocisteinemia leve o moderada únicamente cuando los niveles de folato son muy bajos.

Existen muchos factores adquiridos que regulan los niveles de Hcy. La dieta es un factor fundamental sobre la concentración de Hcy plasmática, ya que determina el estado vitamínico y los niveles de su precursor: la metionina. El consumo abundante de alimentos de origen animal es fuente de metionina y debería estar acompañada por cantidades adecuadas de frutas y vegetales frescos para que el nivel de ácido fólico sea suficiente para neutralizar la Hcy generada.

El ácido fólico y las vitaminas  $B_{12}$  (cobalamina),  $B_6$  (piridoxina) y  $B_2$  (riboflavina) están involucradas en el catabolismo de la Hcy. Por lo tanto su déficit conduciría a la concentración plasmática elevada de Hcy (hiperhomocisteinemia: HHcy).

Hábitos como el consumo elevado de alcohol, cigarrillo, café, vida sedentaria (especialmente en individuos mayores de 65 años) están directamente relacionados con la HHcy<sup>19-21</sup>.

Se han encontrado algunas enfermedades que provocan aumento en los niveles de Hcy, siendo más frecuente la falla renal<sup>22</sup>, causando la disminución de la excreción del aminoácido. Por otra parte, ciertas enfermedades autoinmunes (como la artritis reumatoidea), malignas (como la leucemia linfoblástica aguda, cáncer de mama, ovario y páncreas y en desórdenes mieloproliferativos), enfermedades gastrointestinales (responsables de la absorción deficiente de vitamina  $B_{12}$  y de folato) también podrían ser causa del aumento de la concentración de Hcy.

Drogas como el metotrexate, anticonvulsivantes (como la teofilina) y anticonceptivos orales están asociados al aumento de los niveles de Hcy por interferir con el metabolismo del ácido fólico.

## **EVIDENCIAS CLÍNICAS ASOCIADAS CON HIPERHOMOCISTEINEMIA**

Desde la década de los 90 se han desarrollado una serie de estudios epidemiológicos con la intención de investigar la relación entre HHcy y la enfermedad oclusiva. La mayoría de ellos han encontrado una asociación positiva entre niveles elevados de Hcy y las distintas formas de la enfermedad arterial infarto de miocardio<sup>23,24</sup> accidente cerebrovascular<sup>7,25</sup>; enfermedad vascular<sup>26,27</sup> y venosa (trombosis venosa profunda<sup>28</sup>, tromboembolismo pulmonar<sup>29</sup> o venoso<sup>30,31</sup>). Sus resultados concluyen que los niveles elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular aterosclerótica, a nivel coronario, cerebral y periférico. La magnitud del riesgo resultó similar a la de otros factores tales como hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión y diabetes que, a su vez, ejercen un efecto multiplicativo cuando se combinan con hiperhomocisteinemia. Por otra parte se demostró que la prueba de sobrecarga con metionina permite detectar casos adicionales de hiperhomocisteinemia.

Se han reportado otros estudios que no han encontrado asociación entre HHcy y la enfermedad vascular. Estos últimos son menos numerosos y evalúan menor número de individuos que los primeros. Recientemente se ha publicado<sup>32</sup> un meta-análisis de los estudios epidemiológicos más relevantes ya reportados, para examinar la asociación entre HHcy y trombosis venosa. En este estudio se concluye que un aumento de 5  $\mu$ M en los niveles de Hcy fueron asociados con un riesgo de trombosis venosa 27% mayor (95% CI: 1-59) en estudios prospectivos y 60 % mayor (95% CI: 10-134) en estudios retrospectivos, demostrando una moderada asociación positiva.

No se ha determinado si la hiperhomocisteinemia es responsable de la enfermedad vascular oclusiva o si sólo es un marcador asociado a dicho riesgo. Para esclarecer este interrogante es necesario demostrar si el descenso de los niveles plasmáticos de Hcy disminuye la incidencia de la enfermedad vascular. Con este propósito se están desarrollando trabajos clínicos a gran escala, que

evalúan el efecto de diferentes tratamientos que combinan ácido fólico con vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, y/o el uso de antioxidantes, variando la constitución y la dosis utilizadas.

El estudio PACIFIC tiene por objeto comparar el efecto de utilizar ácido fólico en alta dosis (2 mg/día, dosis habitualmente usada en intervención farmacológica) o en baja dosis (0,2 mg/día) comparado con placebo. Este ensayo randomizado, doble ciego concluyó que ambas dosis de ácido fólico redujeron los niveles de Hcy, pero el efecto de la dosis elevada fue un tercio mayor que la dosis baja. Por lo tanto, la fortificación de alimentos resultaría de utilidad para reducir los niveles de Hcy en la población general, mientras que la dosis farmacológica (2 mg/día) sería conveniente para individuos de alto riesgo<sup>33</sup>.

Hasta el momento se reportó una relación inversa entre la dosis del suplemento dietario con vitamina B y el riesgo de stroke isquémico<sup>34</sup>. Parecería que este tratamiento no previene un stroke secundario evaluando dos años de seguimiento, aunque es necesario prolongar estos estudios para obtener resultados concluyentes<sup>35</sup>.

En el estudio WACS (Women's Antioxidant Cardiovascular Study) se evalúa el uso de antioxidantes, ácido fólico y vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> en 5218 mujeres con enfermedad cardiovascular y 3 o más factores de riesgo coronario. Se realiza el seguimiento durante 6,5 años, de 661 casos confirmados de infarto de miocardio, stroke isquémico, angioplastia coronaria, o *by pass*. Después de agrupar a las pacientes por edad y medicación antihipertensiva usada, se asignó el tratamiento en forma randomizada. Encontraron que la presión sanguínea sistólica resultó el predictor más fuertemente relacionado con enfermedad cardiovascular<sup>36</sup>.



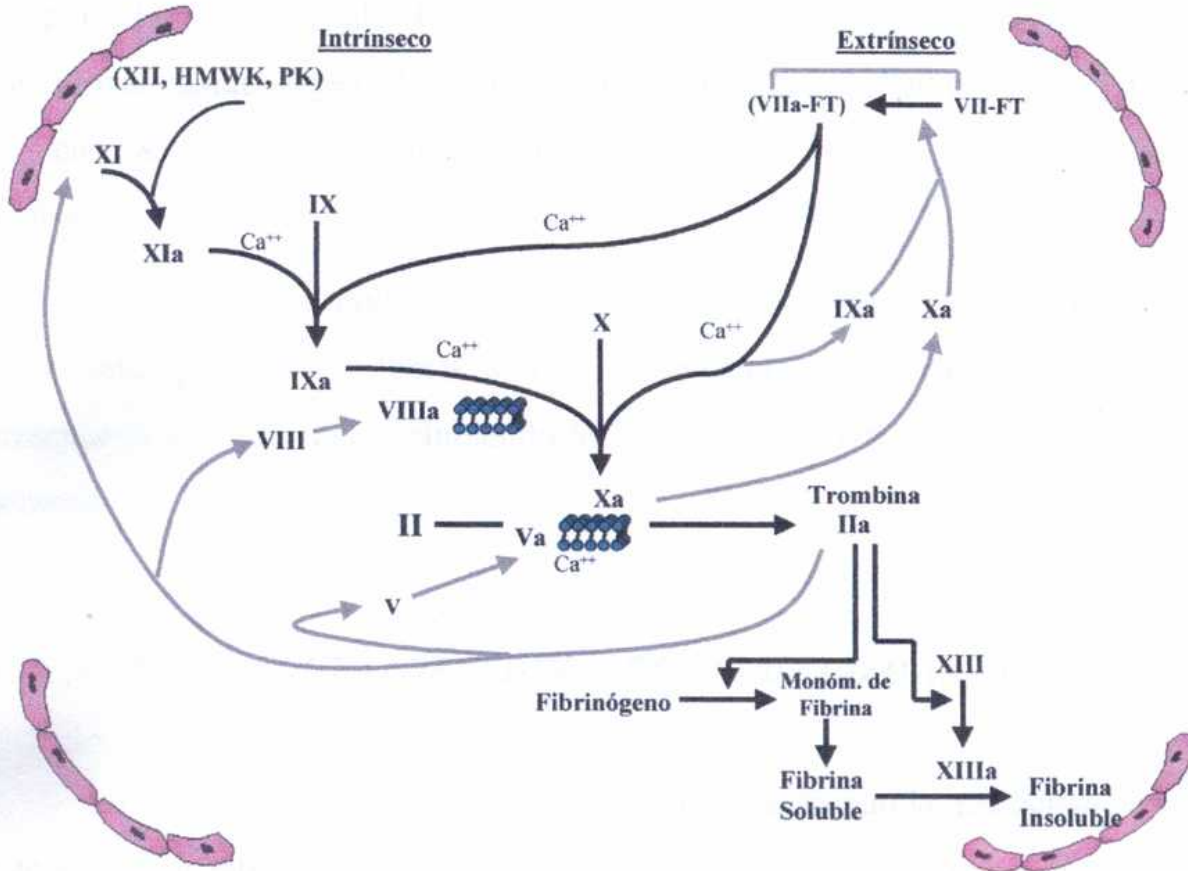
## EL SISTEMA DE COAGULACIÓN

Cuando se produce una injuria en los tejidos, la pérdida de sangre se detiene con la formación de un tapón hemostático. Para formarlo, el Fbg se polimeriza por activación de la cascada de coagulación, formando una matriz denominada fibrina. Células inflamatorias y endoteliales migran dentro de la matriz y estimulan el proceso de reparación. Mientras se produce la reconstrucción de la pared vascular afectada, el coágulo se disuelve con la acción del sistema fibrinolítico. La coagulación (formación de la red de fibrina) y la fibrinólisis, deben ser comprendidas como un sistema dinámico que requiere una adecuada perfusión del sistema vascular, una perfecta eliminación de los productos activos de la coagulación y fibrinólisis, a la vez que el funcionamiento adecuado de sus inhibidores fisiológicos. La alteración de alguno de estos mecanismos llevará a una hipo ó hipercoagulabilidad. Las proteínas que constituyen el sistema de coagulación se llaman factores y generalmente se encuentran en circulación en forma de precursores enzimáticos inactivos o zimógenos. Mac Farlane y Davie propusieron un sistema de reacciones secuenciales, donde una enzima activa a un sustrato (por una proteólisis específica), el cual se convierte a su vez en una enzima activa para el próximo sustrato, desencadenando un sistema de activación en cascada<sup>37</sup>.

La mayoría de estas enzimas proteolíticas son serinoproteasas porque su sitio activo está constituido por la tríada catalítica que incluye a la serina (generalmente Ser-His-Asp). Los precursores de serinoproteasas en el sistema de coagulación son: FII, FVII, FIX y FX que se transforman en los factores activos (a), FIIa llamado trombina (Trb), FVIIa, FIXa y FXa respectivamente. Dentro de los factores de coagulación se encuentran además cofactores proteicos no enzimáticos (Factor tisular, FV y FVIII) cuya función es favorecer la actividad de serinoproteasas<sup>38</sup>. El fibrinógeno (Fbg) o Factor I, es el único componente del sistema que actúa sólo como sustrato y el FXIIIa es la transglutaminasa que estabiliza la fibrina.

Los métodos de laboratorio, han permitido estudiar separadamente dos vías de activación del sistema de coagulación: una "extrínseca" dependiente del factor tisular (TF) y una "intrínseca" independiente del TF, conduciendo ambas a la formación de Trb con distinta velocidad de reacción. Una vez conocidas las interacciones y mecanismos de retroalimentación positiva entre ambas vías, se ha propuesto un esquema unificado: la cascada revisada de coagulación (Figura 1). Se considera que el factor tisular (TF) es el principal iniciador del sistema de coagulación in vivo. Es un cofactor que no requiere activación previa para desempeñar su función. Promueve la autoactivación del FVII<sup>39-40</sup>; actúa además como cofactor del FVIIa, de modo que reordena el sitio activo y favorece su actividad catalítica sobre sus sustratos: el FX y FIX<sup>41-42</sup>. La acción del complejo TF-FVIIa sobre el FX unido a la membrana fosfolipídica genera FXa. Estas primeras trazas de FXa son importantes para la generación de pequeñas cantidades de Trb, la cual participa de un importante mecanismo de retroalimentación positiva, activando a los FV, FVIII, FIX y a las plaquetas.

El complejo TF-FVIIa también activa al FIX. En condiciones basales el FIXa por sí solo es incapaz de activar al FX; necesita la formación de complejo tenasa, compuesto por FIXa, FVIIIa, fosfolípidos procoagulantes aportados por las membranas plaquetarias y Ca<sup>+2</sup>, en cuyo caso la activación del FX por el FIXa aumenta en varios ordenes de magnitud. La gran producción de FXa a través del complejo tenasa asegura la propagación de la activación y la generación de mayores cantidades de Trb que conducen a la formación de fibrina. El principal sustrato del FXa es la protrombina (FII), zimógeno que es clivado por el complejo protrombinasa (formado por FXa, FVa, Ca<sup>2+</sup> y membrana fosfolipídica) para generar Trb, enzima clave del sistema de coagulación por sus múltiples funciones



**Figura 1:** Esquema de la Activación del Sistema de Coagulación.

Se considera que la Trb y el FXa producidos por la acción de TF-FVIIa son insuficientes para la formación de un tapón hemostático. Para esto sería necesario reforzar la generación de Trb a través de la acción del FIX. Pequeñas cantidades de Trb activan al FXI en un clivaje proteolítico potenciado por la acción del dermatán sulfato, heparina y/o sulfátidos<sup>44</sup>. El FXIa activa al FIX. El FIXa genera FXa mediante el complejo tenasa. Actualmente se considera que la función del FXI en la cascada revisada de coagulación es la de mantener la activación del sistema más que favorecer su iniciación función propuesta originalmente por la vía intrínseca.

La trombina es la enzima que corta específicamente cuatro de las varias uniones Arg-Gly de la molécula de Fbg, liberando dos moléculas de

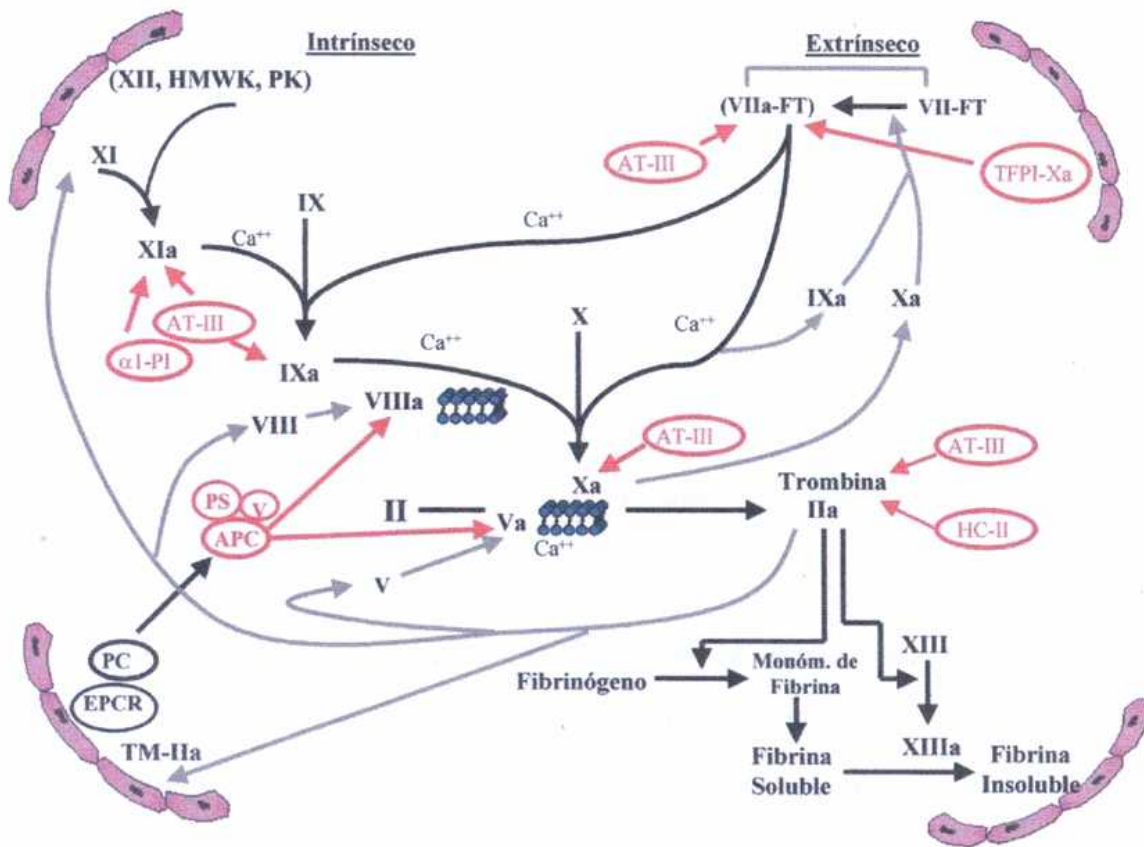
fibrinopéptidos A y dos de B (FPA, FPB), generando monómeros de fibrina que polimerizan dando origen a la red de fibrina soluble <sup>45</sup>. La trombina además activa al factor XIII. El factor XIIIa entrecruza la fibrina soluble generando fibrina estable <sup>46</sup>.

Debido a las múltiples funciones de la trombina dentro del sistema hemostático y en otros sistemas, su regulación es importante, proceso que puede presentarse a dos niveles: inhibiendo la formación de Trb y bloqueando la Trb generada.

### ***MECANISMO REGULATORIO DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN.***

Los inhibidores fisiológicos de la coagulación frenan la autoactivación de este sistema localizando y limitando la formación de coágulo al lugar de la lesión. Para controlar la respuesta del sistema de coagulación, existen tres mecanismos principales de inhibición (Figura 2):

- 1- Inhibidor de la vía extrínseca (TFPI).
- 2- Sistema de la proteína C (PC).
- 3- Inhibidores de serinoproteasas (ATIII, HCII, C<sub>1</sub>-inhibidor).



**Figura 2:** Esquema de la Inhibición del Sistema de Coagulación.

1- El TFPI es un inhibidor de serinoproteasas sintetizado por célula endotelial, que actúa sobre el FXa y el FVIIa. Se considera que la inhibición de FVIIa ocurre en un proceso en dos etapas, primero se forma el complejo TFPI-FXa y luego el complejo cuaternario TFPI-FXa-FVIIa-TF. Se ha demostrado<sup>47-48</sup> que el TFPI es un inhibidor potente del complejo FVIIa-TF que se encuentra en circulación, en la superficie de las membranas y en la matriz extracelular. En la forma revisada de la cascada de coagulación, luego de un daño tisular se expone el TF y se forma el complejo TF- FVIIa, lo que generaría cantidades limitadas de FXa y FIXa. Con el FXa se iniciaría la regulación del sistema por acción de TFPI. De esta manera se manifiesta la necesidad de producción de FIXa a través de la acción del complejo tenasa (FVIIIa potenciado por el FVa), de modo de asegurar la generación de trombina requerida para la formación del coágulo.

**2- El Sistema de la Proteína C:** El mecanismo de inhibición mediado por la proteína C (PC) está integrado por varios componentes, entre ellos la PC, proteína S (PS), trombomodulina (TM), FV y el receptor endotelial de la PC (EPCR). La PC es un zimógeno vitamina K dependiente; su síntesis es básicamente hepática. La actividad anticoagulante de la PC radica en su capacidad de inactivar a los cofactores de la coagulación FVa y FVIIIa. La Trb se une a la TM, proteína de la membrana de la célula endotelial y el complejo Trb-TM formado, activa a la PC a PC activada (APC), en una reacción dependiente de calcio <sup>49</sup>. La APC en presencia de FV y Proteína S (cofactor indispensable de la APC) inhibe a los FVa y FVIIIa.

La PS es una proteína vitamina K dependiente, sintetizada en el hepatocito y en menor proporción en células endoteliales y plaquetas. El 40% de la PS circula libremente y es la única responsable de la actividad de cofactor de la APC. La PS presenta un efecto inhibitorio independiente de su función como cofactor de la APC, inhibiendo directamente la formación de Trb mediante interacciones con el FVa y el FXa <sup>50</sup>.

**3- Sistema de inhibición de Serinoproteasas (Serpinas):** Son proteínas que regulan la actividad de las enzimas del sistema de coagulación y fibrinolítico. Tienen una estructura flexible que les facilita ejercer su función inhibitoria, bloqueando el centro activo de la enzima. Provoca un cambio conformacional profundo en la serinoproteasa y forma un complejo enzima-inhibidor altamente estable, que es depurado de la circulación como tal. Las principales proteínas de este grupo son: Antitrombina (ATIII), Cofactor II de la Heparina (HCII), C<sub>1</sub>-inhibidor y la  $\alpha_1$ -antitripsina.

La ATIII se sintetiza en hígado, inhibe Trb, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa. También inhibe al complejo FVIIa-FT, a la plasmina y en menor grado a calicreínas, a la proteinasa del complemento y a la tripsina. Su acción inhibitoria está ampliamente potenciada por la heparina (más de 1000 veces) y otros glicosaminoglicanos <sup>50-51</sup>.

El **cofactor II de la Heparina (HCII)** es una proteína plasmática que inhibe específicamente Trb, proceso que es potenciado por el glicosaminoglicano dermatán sulfato (DS) <sup>52</sup>. Luego de la injuria endotelial, el HCII plasmático se uniría específicamente a las cadenas de DS de la matriz extracelular y regularía las múltiples funciones de la Trb.

El **C1- inhibidor** es una serpina altamente glicosilada que inhibe la actividad de los componentes C1r y C1s del sistema de complemento, FXII $\alpha$ , FXI $\alpha$ , calicreina y plasmina <sup>53</sup>. Probablemente juega un rol en la inhibición de la fibrinólisis dependiente del sistema de contacto.

Su concentración (1,7  $\mu$ M) es semejante a la de otros inhibidores plasmáticos como  $\alpha_2$ -AP,  $\alpha_2$ -macroglobulina y glicoproteína rica en histidina, que se encuentran entre 1 y 3  $\mu$ M.

Esta breve introducción sobre un tema tan complejo y ampliamente estudiado, es sólo el marco para exponer los puntos específicamente vinculados a este trabajo de tesis. Para un desarrollo más detallado del tema se dispone de libros actualizados que organizan la extensa información bibliográfica <sup>54-56</sup>.

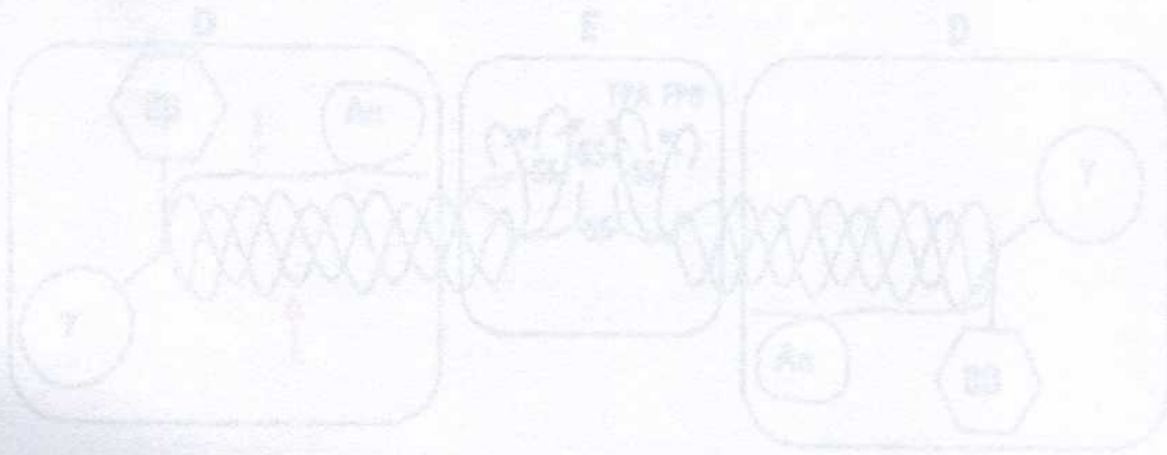
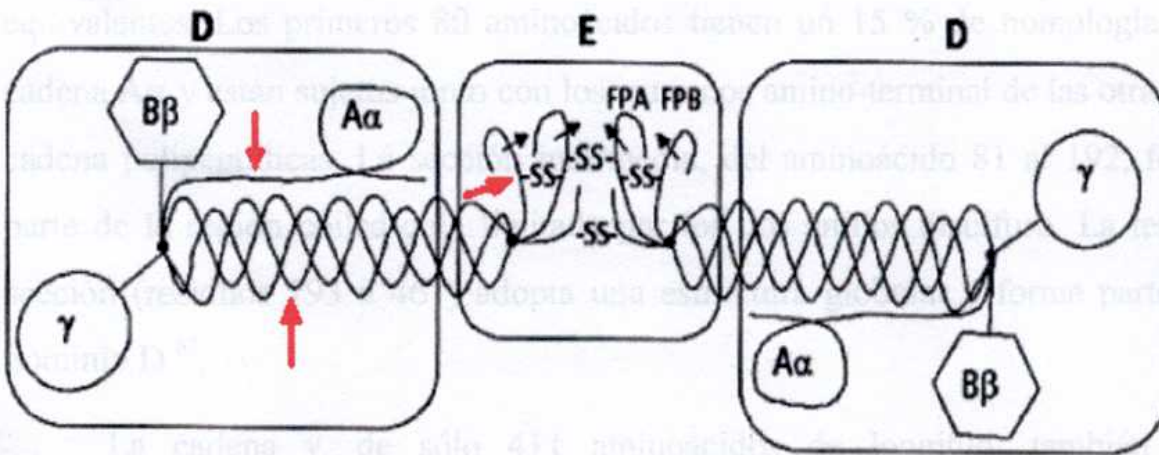


Figura 31 Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Las flechas negras señalan los sitios donde ataca la Trb y las rojas el de ataque por Plasmina.

## LA MOLÉCULA DE FIBRINÓGENO

El **Fbg** (Figura 3) es una glicoproteína trinodular, de gran tamaño (340 kD). Es un hexámero formado por tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes designadas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ , (de 63,5, 56 y 47 kD respectivamente) unidas por puentes disulfuro <sup>57</sup>. Mide 45 nm de longitud y 9 nm de diámetro. Está dividida en tres secciones de tamaño equivalente. El nódulo central, llamado dominio E, está formado por los 6 extremos aminoterminal de las cadenas, unidos por puentes disulfuro. Los dos dominios D de los nódulos externos están formados por los extremos carboxiterminal de las cadenas  $B\beta$  y  $\gamma$ . Estos subdominios están localizados en forma diagonalmente opuesta respecto al eje longitudinal de la molécula. Por difracción de rayos X se observa que los segmentos centrales de las tres cadenas polipeptídicas forman una triple  $\alpha$ -hélice conocida como región (coiled-coil) que une los dominios D-E <sup>58</sup>. Esta región, de 111-112 aminoácidos de longitud, está sujeta en sus extremos por uniones disulfuro y proporciona estabilidad mecánica a la molécula.



**Figura 3:** Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Las flechas negras señalan los sitios donde cliva la Trb y las rojas el de clivaje por Plasmina.



La estructura primaria de cada cadena polipeptídica humana ha sido determinada por secuenciación aminoacídica y nucleotídica. Entre las cadenas del Fbg existe una importante homología que sugiere un gen ancestral común. La homología entre las cadenas está definida por la conservación de la ubicación de los anillos disulfuro en cada una de las cadenas <sup>59</sup>.

La cadena A $\alpha$  tiene una longitud de 610 aminoácidos. La porción aminoterminal, desde el aminoácido 1 al 194, está unida por puentes disulfuro a las cadenas B $\beta$  y  $\gamma$ . La porción que se encuentra entre el aminoácido 195 y el 239, es un dominio sensible a proteasas, que contiene gran cantidad de prolina y varios sitios de clivaje por plasmina, señaladas por las flechas rojas en la Figura 3. La sección entre los aminoácidos 240 y 424, es muy rica en aminoácidos polares y está formada por la repetición de una secuencia de 13 aminoácidos <sup>60</sup>. Dos residuos glutamina en las posiciones 328 y 366 sirven como sitio aceptor del entrecruzamiento por FXIII, generalmente con fibronectina y  $\alpha_2$ -antiplasmina. En el extremo carboxiterminal de la cadena A $\alpha$  presenta sitios de unión a la fibronectina <sup>61</sup> y a la  $\alpha_2$ -antiplasmina <sup>62</sup>.

La cadena B $\beta$ , de 461 aminoácidos, está dividida en tres secciones equivalentes. Los primeros 80 aminoácidos tienen un 15 % de homología a la cadena A $\alpha$  y están sujetos junto con los extremos amino-terminal de las otras dos cadenas polipeptídicas. La sección intermedia, del aminoácido 81 al 192, forma parte de la región coiled-coil, limitada por los dos anillos disulfuro. La tercera sección (residuos 193 a 461) adopta una estructura globular y forma parte del dominio D <sup>63</sup>.

La cadena  $\gamma$ , de sólo 411 aminoácidos de longitud, también está subdividida en tres secciones. La primera tiene sólo 18 aminoácidos. Por delección genética, no tiene el dominio clivable que presentan las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$ , que darán origen a los fibrinopéptidos A y B <sup>63</sup>. El segmento intermedio (aminoácidos 19 a 129) forma parte de la región coiled-coil y los anillos disulfuro que unen a las tres cadenas polipeptídicas. La sección final (aminoácidos 130 a 411) forma el

segmento globular del dominio D. La cadena  $\gamma$  y la  $B\beta$  presentan el 35 % de homología en la secuencia del tercio final de la cadena. La cadena  $\gamma$  tiene una extensión carboxiterminal de 18 aminoácidos más que la cadena  $B\beta$ . Esta porción forma un segmento globular que participa en el entrecruzamiento mediado por FXIII<sup>64</sup>, adhesión celular y agregación plaquetaria<sup>65</sup>.

En la molécula de Fbg humano coexisten dos formas de cadena  $\gamma$  de diferente tamaño y carga: la cadena  $\gamma$  presente en el 85 % de las moléculas de Fbg es más corta y tiene más carga neta positiva que la cadena  $\gamma'$ . Las plaquetas contienen, en sus gránulos  $\alpha$ , exclusivamente Fbg con cadenas  $\gamma$ . Las cadenas  $\gamma'$  transportan al FXIII e interfieren con la agregación plaquetaria<sup>66</sup>. El Fbg forma complejos de alto peso molecular con el FvW. Ambas proteínas se unen en forma competitiva a la glicoproteína IIb-IIIa de la membrana plaquetaria. El Fbg se une también a células endoteliales, interviniendo en uniones celulares, migración celular y angiogénesis. La GP IIb-IIIa de la célula endotelial se une por la porción N-terminal y C-terminal de la cadena  $A\alpha$  del Fbg. El Fbg interviene en pinocitosis, quimiotaxis, crecimiento y migración de fibroblastos y células de músculo liso, entre numerosas interacciones celulares<sup>67-68</sup>.

La molécula de Fbg tiene 66 residuos cisteína, de los cuales utiliza 62 para formar puentes disulfuro intramoleculares: 14 enlaces intracatenarios y 17 intercatenarios, de modo que una molécula tiene 4 grupos tioles libres.

La molécula de Fbg en el plasma humano es heterogénea. El 69 % del Fbg plasmático es Fbg tipo I (PM 340 kD), de mayor coagulabilidad. El 29 % es Fbg tipo II (320 kD) y el 2 % restante Fbg tipo III (300 kD). El Fbg pierde peso molecular por degradación proteolítica de la región carboxi-terminal de la cadena  $A\alpha$ . Esta degradación se produce tanto *in vivo* como *in vitro*, alterando las cargas, solubilidad y función de la proteína<sup>69</sup>.

El Fbg es sintetizado en el hígado. Tres genes separados, ubicados en el brazo largo del cromosoma 4 (q23-q32), codifican la síntesis de las tres clases de cadenas polipeptídicas<sup>70</sup>. Las cadenas  $A\alpha$  y  $\gamma$  se sintetizan en exceso, con distinta

velocidad, mientras la síntesis de la cadena B $\beta$  limita la velocidad de acoplamiento de la molécula. La formación de puentes disulfuro, seguida de reacciones de glicosilación, fosforilación y sulfonación, completan la estructura terciaria y cuaternaria del Fbg<sup>70</sup>. La molécula de Fbg es secretada a circulación, donde su concentración en plasma normal oscila entre 2 y 4 g/l ( $10^{-5}$  M). Esta proteína, es reactante de fase aguda y puede estar aumentada en infecciones, cirugías, quemaduras, embarazo e infarto de miocardio. Los niveles elevados de Fbg están asociados a las enfermedades arteriales oclusivas<sup>71-72</sup>, resultando un marcador predictivo del evento vascular isquémico<sup>73-74</sup>.

Los iones calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) modulan la estructura y función del Fbg. Hay tres sitios de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  dentro de la molécula de Fbg. Dos de ellos, localizados en el dominio  $\gamma$ , tienen alta homología al sitio de unión al  $\text{Ca}^{+2}$  de la calmodulina. Cuando el ión  $\text{Ca}^{+2}$  ocupa estos sitios, la cadena  $\gamma$  es protegida de la degradación por la plasmina y disminuye la susceptibilidad a la desnaturalización por efecto del calor o del medio ácido. El tercer sitio está localizado en el dominio E. Tiene tanta afinidad por el  $\text{Ca}^{+2}$  (constante de disociación  $K_D = 10^{-5}$  M) que en condiciones plasmáticas ( $\text{Ca}^{+2}$  libre 1,5 mM) todos los sitios están ocupados<sup>75</sup>. Como se verá más adelante, los iones  $\text{Ca}^{+2}$  también regulan la polimerización de la fibrina, aumentando la velocidad y grado de asociación lateral de las protofibras para formar la red de fibrina<sup>76</sup>. Existen, además de 10 a 15 sitios que unen  $\text{Ca}^{+2}$  con baja afinidad.

Los carbohidratos unidos a las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  modulan la polimerización de la fibrina. Se produce polimerización defectuosa del Fbg cuando se modifica el contenido de los carbohidratos, especialmente del ácido siálico, como ocurre en casos de cirrosis<sup>77</sup>.

Las anormalidades estructurales del Fbg, que alteran su funcionalidad provocando desórdenes de la coagulación, son llamadas disfibrinogenemias. Estas anormalidades pueden ser congénitas o adquiridas. Las congénitas se transmiten en forma autosómica dominante o codominante, no relacionadas al

cromosoma X. Las alteraciones genéticas pueden incluir mutaciones puntuales, 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 Trb, plasmina o FXIIIa. El 40% de las disfibrinogenemias congénitas detectadas no presentan alteraciones clínicas, mientras que el resto puede manifestarse por trastornos hemorrágicos, trombóticos, a veces ambos en el mismo paciente, abortos espontáneos o cicatrización defectuosa<sup>78</sup>.

Las anormalidades adquiridas del Fbg son producidas generalmente por trastornos hepáticos severos (cirrosis hepática y viral, hepatitis tóxica), carcinoma hepático, renal, etc. La disfibrinogenemia adquirida es un marcador de ciertas enfermedades malignas que acompaña a la actividad tumoral, desapareciendo en remisión y reapareciendo en una crisis posterior. El Fbg anormal se caracteriza por la polimerización defectuosa de los monómeros de fibrina, muchas veces asociada al contenido elevado de ácido siálico. Las cargas negativas del ácido siálico generan fuerzas repulsivas entre los monómeros, provocando una polimerización más lenta<sup>79</sup>.

## LA TROMBINA

Es la enzima clave del proceso hemostático, debido a sus importantes y múltiples funciones: presenta actividad procoagulante, reguladora anticoagulante y inhidora de la antifibrinólisis.

Su precursor, la protrombina (FII) es sintetizada en el hígado y pertenece a los factores dependientes de vitamina K. Su concentración plasmática es de 100  $\mu\text{g/ml}$  (1-2  $\mu\text{M}$ ) y permanece en circulación entre 2 y 3 días. Es una glicoproteína de una cadena de 69 kD (576 aminoácidos), que contiene 3 cadenas de carbohidratos unidos a nitrógeno y 10 residuos de Ác.  $\gamma$ -carboxiglutámico. Posee 4 dominios: el dominio Gla (residuos 1 a 40), el kringle 1 (residuos 41 a 155), el kringle 2 (residuos 156 a 271) y el dominio precursor de serinoproteasa (residuos 272 a 579) <sup>80</sup>.

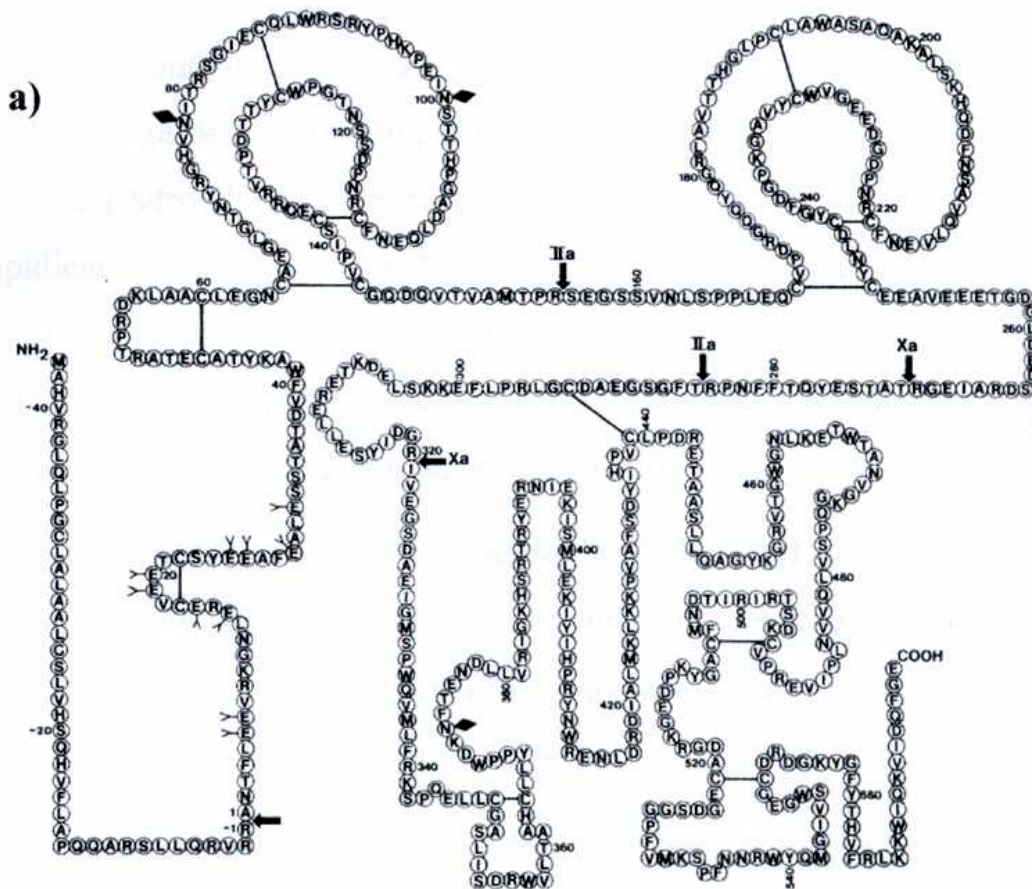
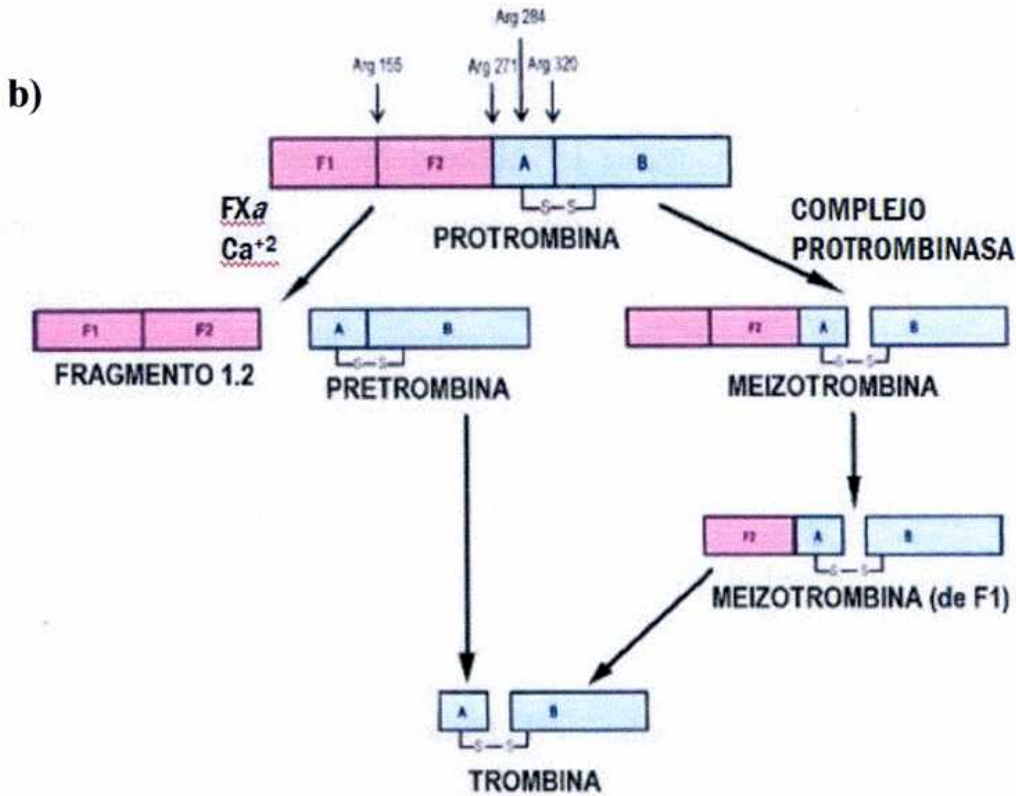


Figura 4: a) Esquema de la estructura de la protrombina.



**Figura 4: b)** Esquema de activación de la protrombina.

La protrombina es activada a Trb por el clivaje de la unión Arg 320 generando meizotrombina (como producto intermedio), reacción catalizada por el complejo protrombinasa, formado por  $FV_a$ ,  $FX_a$  y calcio sobre membranas fosfolípídicas. Luego, la unión Arg 271 de la meizotrombina es clivada para generar Trb y fragmentos 1-2 de la protrombina. Existe otra vía más lenta de activación de la protrombina, catalizada por el  $FX_a$  en presencia de  $Ca^{+2}$ , que corta primero la unión Arg 271 y luego la Arg 320.

**La trombina** es una glicoproteína de 40 kD, formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. La cadena  $\alpha$  es corta (36 aminoácidos) y la cadena  $\beta$  es larga (259 aminoácidos) y contiene el sitio activo, compuesto por la tríada catalítica Hist-Asp-Ser<sup>81</sup>.

La principal función de la trombina es iniciar la formación de la fibrina. Además, activa plaquetas, FV, FVIII, FXI y FXIII, interviniendo en la activación, amplificación y propagación de la cascada de coagulación.

La trombina se une a Fbg, fibrina, cofactor II de la heparina (HCII), receptor de trombina, trombomodulina (TM), entre otras proteínas, a través de los

exositos de unión aniónica” (conjunto de aminoácidos cargados positivamente que están presentes en los extremos de la molécula)<sup>82</sup>. Su unión a TM induce la activación de la proteína C (inhibidor del sistema), de manera que inicia la regulación de la coagulación. Además, induce la activación del inhibidor de la fibrinólisis activable por Trb (TAFI), interviniendo en la regulación de la fibrinólisis.

Una vez que la trombina es generada, es incorporada al trombo en formación donde sus inhibidores (ATIII, HCII,  $\alpha_2$ -macroglobulina) no pueden penetrar, concentrando a la trombina en el lugar de la lesión y favoreciendo su actividad sobre los sustratos específicos.

La trombina posee propiedades adhesivas y quimiotácticas, no relacionadas con su función enzimática. Es un potente activador de células endoteliales y sanguíneas. Participa en proliferación celular, angiogénesis, en procesos inflamatorios, neoplásicos, y virales<sup>83</sup>.

Los diferentes intermediarios de la trombina tienen distintas constantes de actividad enzimática y velocidades de reacción, generando estados diferentes según la especie molecular que predomina. Esto indicaría que la activación de protrombina *in vivo* puede llevar a distintos estados: “anticoagulante y profibrinolítico” cuando predomina trombina, o “coagulante y antifibrinolítico” cuando predomina meizotrombina.

### **LA RED DE FIBRINA.**

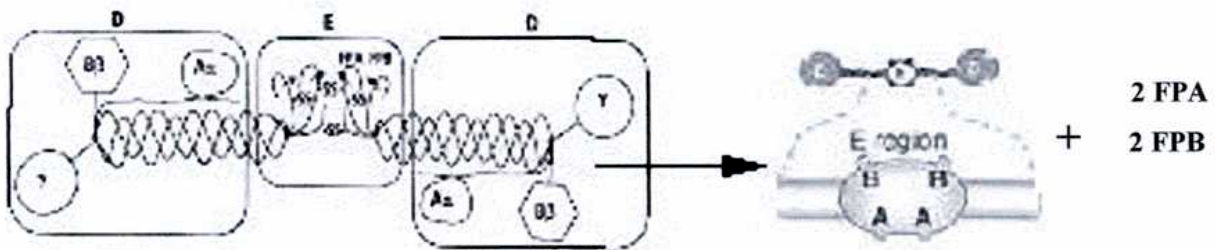
La formación y estabilización de la red de fibrina es el proceso por el cual el fibrinógeno soluble es convertido en un coágulo de fibrina insoluble por acción de la trombina y el FXIIIa. La conversión de Fbg en una matriz de fibrina insoluble ocurre en tres etapas principales<sup>84</sup>:

- 1) el clivaje de los fibrinopéptidos por la trombina.
- 2) la polimerización de la fibrina y
- 3) la estabilización covalente de la red por el FXIIIa.

Las anomalías congénitas o adquiridas en las proteínas involucradas en la estabilización de la fibrina puede conducir a serios desórdenes, hemorrágicos o trombóticos, demostrando la importancia de estas proteínas en la regulación hemostática.

### ***Liberación de Fibrinopéptidos A y B.***

La trombina cliva cuatro enlaces Arg-Gly específicos de los extremos aminoterminal de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$  de la molécula de Fbg: cliva las uniones Arg<sub>16</sub>-Gly<sub>17</sub> de las dos cadenas  $A\alpha$  y Arg<sub>14</sub>-Gly<sub>15</sub> de las 2 cadenas  $B\beta$ , liberando fibrinopéptidos A y B y generando monómeros de fibrina (Figura 5). De esta forma se inicia el proceso por el cual las moléculas de fibrina se interconectan para formar un gel. El clivaje de FPB comienza lentamente y su velocidad aumenta durante el ensamble de las fibras de fibrina, lo que hacía pensar que la liberación de FPA ocurría primero<sup>85</sup>.



**Figura 5:** Formación de los monómeros de fibrina.

### ***Polimerización de la Fibrina***

Los clivajes de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$  catalizados por la Trb conduce a la liberación de los fibrinopéptidos A y B (FPA y FPB), quedando formadas dos prominencias "A" y "B", en la región central E. Estas prominencias incluyen la



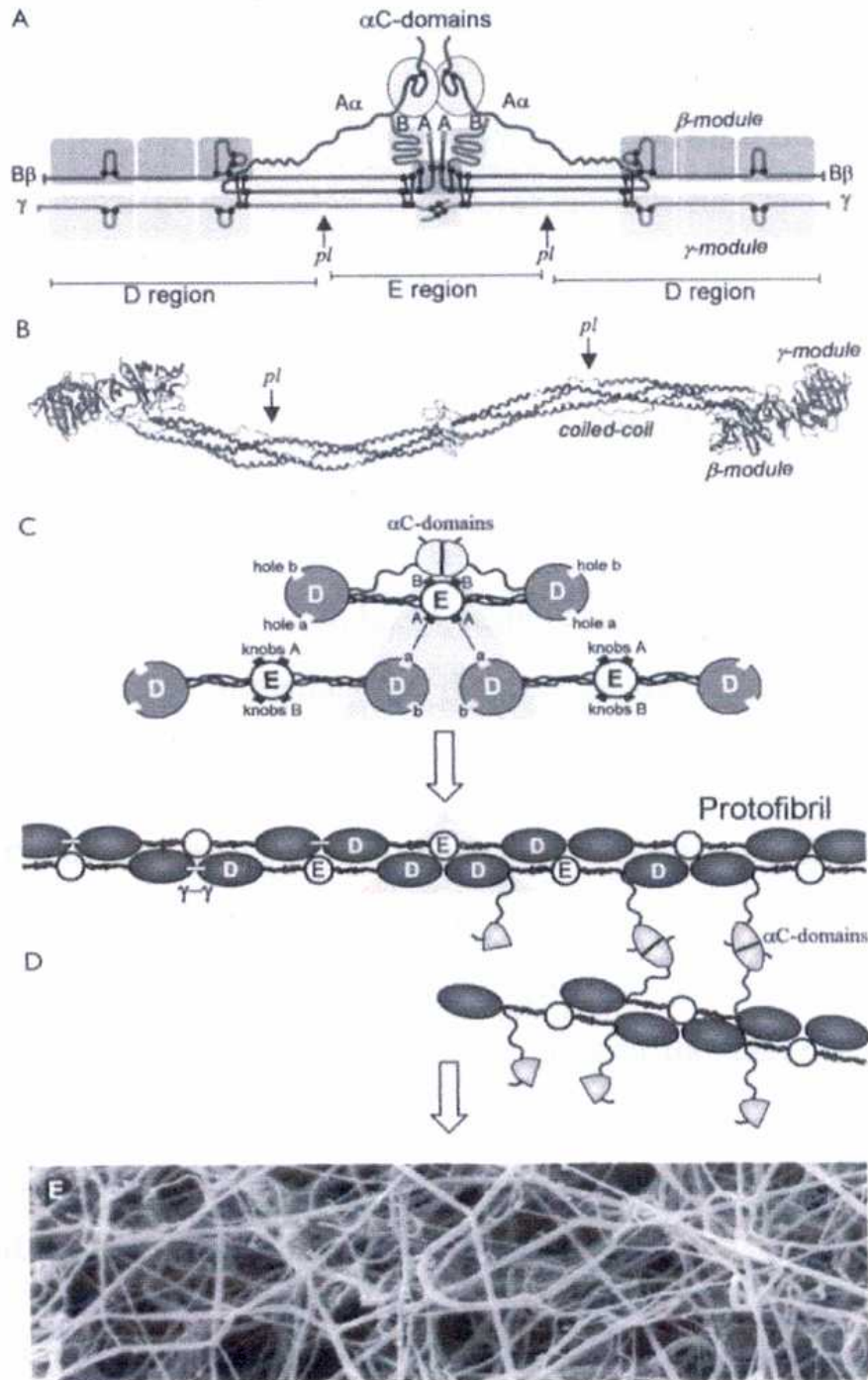
secuencia aminoterminal Gli-Pro-Arg y Gli-Hist-Arg respectivamente, que interactúan con pequeñas cavidades localizadas en la cadena  $\gamma$  de la región D de moléculas adyacentes: los sitios complementarios "a" y "b" (Figura 6 C). Estas interacciones son críticas para la formación de los polímeros de fibrina<sup>86</sup>. Las dos protuberancias centrales del primer monómero estabilizan la interacción lineal del segundo monómero con el tercero. El proceso de elongación involucra la unión, de monómeros adicionales que se unen por contacto D-D entre monómeros contiguos además de otro D-E entre monómeros adyacentes<sup>87</sup>. El resultado es la formación de una larga **dobles cadena** de protofibras compuesta de monómeros alineados. Ambas cadenas están desplazadas, una respecto a la otra, la longitud de medio monómero.

Resumiendo: Los sitios de unión del dominio E de los monómeros de fibrina interactúan no covalentemente con los sitios complementarios del dominio D de un monómero de fibrina adyacente (Figura 6 C). El contacto D-E aporta estabilidad a la elongación del polímero.



Figura 6: Formación de fibras de fibrina.

El extremo carboxiterminal de la cadena  $\gamma$  juega un rol importante en la polimerización de la fibrina, porque tiene al menos cinco sitios de unión a dominios E de otros monómeros y permite la formación de una estructura tridimensional de moléculas de fibrina unidas por interacciones débiles. Luego de la formación de largas protofibras, éstas pueden ensamblarse lateralmente con otras protofibras mediante interacciones débiles, generando fibras más gruesas. Por microscopía electrónica se observa en el 33g una red de áculos mayores (D-E-D) y



**Figura 6:** Formación de fibras de fibrina.

El extremo carboxiterminal de la cadena  $\gamma$  juega un rol importante en la polimerización de la fibrina, porque tiene al menos cinco sitios de unión a dominios E de otros monómeros y permite la formación de una estructura tridimensional de moléculas de fibrina unidas por interacciones débiles. Luego de la formación de largas protofibras, éstas pueden ensamblarse lateralmente con otras protofibras mediante interacciones débiles, generando fibras más gruesas. Por microscopía electrónica se observa en el Fbg tres nódulos mayores (D-E-D) y

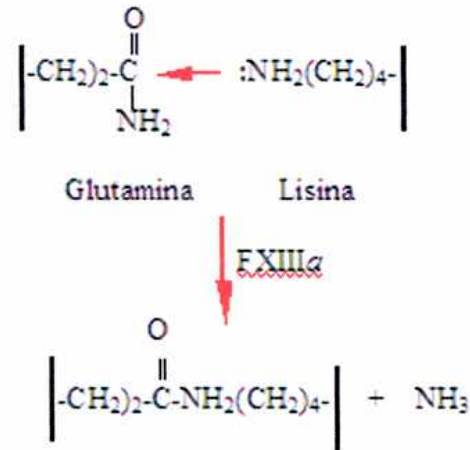
puede verse en algunas moléculas, un cuarto nódulo. Se ha sugerido que éste último corresponde a la interacción entre los dos dominios  $\alpha$ C de una misma molécula de Fbg<sup>89-91</sup> (Figura 6 A). Los dominios  $\alpha$ C están constituidos por la región carboxiterminal de la cadena  $\alpha$ , que resulta adherida al cuerpo de la molécula del Fbg por una porción del polipéptido que actúa como conector flexible<sup>92</sup>.

Durante el ensamble de la fibrina los dos dominios  $\alpha$ C de una molécula de fibrinógeno se disocian y se reasocian intermolecularmente por interacciones no covalentes, promoviendo la agregación lateral de protofibras permitiendo el ensamble lateral de las protofibras en haces, resultando una red tridimensional<sup>87-93</sup>. Estas interacciones no covalentes son distintas de los contactos D-E y son sensibles a cambios de pH, fuerza iónica y temperatura<sup>94</sup>.

La polimerización es un proceso reversible y exotérmico. La naturaleza exotérmica del proceso deriva de uniones puente de hidrógeno entre las moléculas de fibrina en equilibrio reversible que puede ser influenciado por cambios de pH. Sólo el 20 % del volumen del gel está formado por proteínas, mientras que el 80 % restante es solvente<sup>95-96</sup>. Las protofibras se interconectan y forman una red espacial de fibrina soluble. La fibrina soluble se entrecruza por acción del FXIIIa, generando fibrina estable.

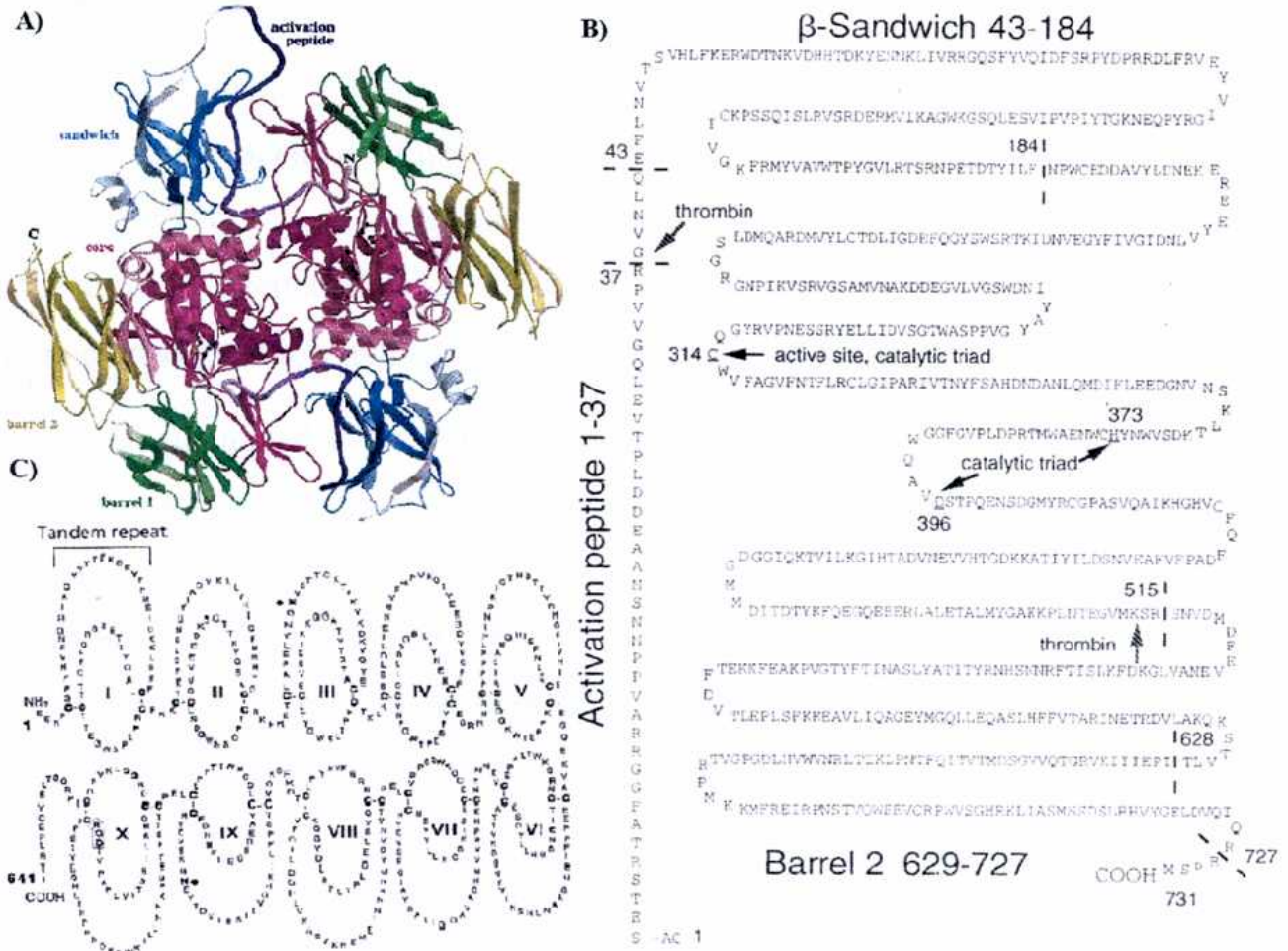
### **La Estabilización de la Fibrina: el FXIII**

La fase final de la formación de fibrina involucra la generación de uniones covalentes entre distintos polipéptidos de la molécula de fibrina, catalizadas por el FXIIIa<sup>97-98</sup>. El FXIII plasmático es activado fisiológicamente por trombina a F//XIIIa, en una reacción dependiente de iones calcio. El FXIIIa 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<sup>99</sup>.



Además de entrecruzar las fibras de fibrina, el FXIII $\alpha$  une covalentemente distintas proteínas (fibronectina,  $\alpha_2$ -antiplasmina, vitronectina, colágeno, entre muchas otras) entre sí o a la fibrina, lo que señala su intervención en coagulación y fibrinólisis. El FXIII $\alpha$  es la única enzima de la cascada de coagulación sanguínea con un sitio activo cisteína. La concentración plasmática de FXIII es de 10-20 mg/ml (0,90  $\mu\text{mol/L}$ ), el nivel hemostático es sólo del 10 % y el tiempo de vida media oscila entre 4 y 8 días.

La molécula de FXIII plasmático (320 kD) es un tetrámero que contiene dos cadenas A y dos B, unidas no covalentemente por fuerzas de alta afinidad<sup>100</sup> (Figura 7A) La subunidad A posee el sitio activo mientras que la B realiza funciones de transporte y regulación de la actividad de la cadena A.



**Figura 7 :** A) Esquema de la estructura del FXIII.

B) Esquema de la subunidad A del FXIII.

C) Esquema de la Subunidad B del FXIII.

La subunidad A (de 83 kD) contiene el sitio activo, formado por la tríada catalítica Cys 314, His 373 y Asp 396. La subunidad A no tiene carbohidratos unidos; está codificada por los genes localizados en las bandas p 24-25 del cromosoma 6 y es sintetizada principalmente por los megacariocitos y en menor proporción por células progenitoras de monocitos y macrófagos de la médula ósea<sup>100</sup>. Las plaquetas contienen aproximadamente el 50 % de la actividad del FXIII sanguíneo. El FXIII plaquetario está formado sólo por dos moléculas de subunidades A, que poseen similar composición aminoacídica, movilidad electroforética, actividad enzimática e identidad inmunológica que la subunidad A plasmática. El FXIII plaquetario puede ensamblarse con cadenas B para formar

un FXIII indistinguible del plasmático<sup>97</sup>.

La subunidad A del F XIII (de 731 aminoácidos) contiene el residuo serina amino-terminal acetilado. La trombina cliva la unión entre los aminoácidos 37 y 38, liberando el péptido de activación. Los estudios cristalográficos muestran que la estructura secundaria de la subunidad A es predominantemente lámina  $\beta$ , mientras el centro catalítico es una combinación de lámina  $\beta$  y  $\alpha$ -hélice.

La subunidad B (de 80 kD) tiene un gran número de uniones disulfuro intracadena, no contiene ningún grupo sulfhidrilo libre y juega un importante rol en la regulación de la activación del FXIII plasmático. La síntesis de esta subunidad está codificada por la banda q31-q32 del cromosoma 1. Estructuralmente, es una cadena polipeptídica lineal, constituida por 641 aminoácidos distribuidos en 10 unidades repetidas dispuestas en *tandem*. Cada unidad está formada, aproximadamente, por 60 aminoácidos que adoptan una geometría particular por la presencia de dos puentes disulfuro. Estas unidades repetidas dispuestas en tandem son similares a las encontradas en muchas otras proteínas, como  $\beta_2$ -glicoproteína I, Haptoglobina, receptor para IL-2, proteínas reguladoras del complemento, entre muchas otras<sup>101</sup>. Después de la formación de la fibrina, la cadena B no catalítica permanece en el suero, mientras la cadena A está firmemente unida al coágulo de fibrina.

### **Arquitectura de la Fibrina**

La estructura tridimensional y la rigidez de la red de fibrina dependen de varios factores: temperatura, fuerza iónica del medio, concentración de Fbg y de otras proteínas plasmáticas. Muchos autores han estudiado estos factores evaluando las propiedades de la fibrina por distintas metodologías como permeabilidad<sup>102, 103</sup>, elasticidad<sup>102,104</sup>, aumento de densidad óptica durante su formación<sup>102,105</sup> y microscopía electrónica<sup>102-109</sup> entre otros.

El aumento de fuerza iónica produce acortamiento de las fibras, provocando una porosidad marcadamente disminuida de los geles de fibrina<sup>110</sup>.

Los cationes divalentes tienen una importancia relevante en la estructura de la fibrina obtenida a partir de Fbg<sup>111</sup>. El calcio aumenta la rigidez de los geles. La porosidad también aumenta, hasta que la concentración de calcio alcanza niveles entre 10 y 20 mM<sup>112</sup>. El zinc induce fibras de fibrina más gruesas, efecto que parece ser independiente de calcio<sup>113,114</sup>. Además aumenta la permeabilidad (mayor Ks) y la relación masa/largo de las fibras ( $\mu$ ). En cambio el magnesio no ha producido efecto sobre la permeabilidad de la fibrina<sup>115</sup>.

Cuando se utilizan sistemas puros, la estructura final de la fibrina (diámetro de la fibra, distancia entre ramificaciones, tamaño del poro, etc.) está determinada principalmente por factores cinéticos, concentración de Fbg y trombina. Blömbäck y colaboradores<sup>116</sup> estudiaron los geles por distintas metodologías. Cuando la concentración de Fbg o Trb aumenta, las redes de fibrina son más densamente cerradas, formadas por fibras más cortas. Además, disminuye la porosidad determinada por el coeficiente de permeabilidad (Ks). Estos autores también evaluaron las características de fibrina plasmática<sup>117</sup>. Estudiaron la relación masa/largo de las fibras ( $\mu$ ), calculado a partir del coeficiente de permeabilidad Ks y del nivel de Fbg plasmático. Concluyeron que un valor de  $\mu$  disminuido indica que la estructura de la fibrina está alterada, posiblemente por cambios en la hidratación o las dimensiones de la arquitectura de la red. La concentración de fibrinógeno en plasma normal fluctúa dentro de un

estrecho rango (2 a 4 g/l) pero aún estas variaciones modifican la estructura de la fibrina. La situación *in vivo* es más compleja aún, ya que la concentración de Fbg en el entorno de las reacciones es muy diferente a la que se encuentra en circulación.

Cuando se utilizan concentraciones de trombina crecientes el diámetro de las fibras disminuye (198 nm con una concentración de Trb = 0,05 U/ml a 99 nm con una concentración de Trb = 2 U/ml). Hay evidencias directas de que la actividad de Trb produce cambios similares en coágulos preparados a partir de plasma sanguíneo<sup>118</sup>. Las mayores variaciones *in vivo* se producen en la concentración de Trb, debido a los mecanismos fisiológicos complejos que controlan y regulan su actividad.

Los niveles de distintas sustancias plasmáticas pueden modificar la estructura de la fibrina. Se ha reportado que cuando se incuba el plasma con glucosa *in vitro*, aumenta el grosor de las fibras y disminuye la permeabilidad de la fibrina generada, posiblemente por glicosilación del Fbg<sup>118</sup>. Coincidentemente, se han detectado diferencias en la estructura de la fibrina plasmática de pacientes diabéticos<sup>119</sup>. Los lípidos producen poros de mayor tamaño en geles de fibrina que resultan menos rígidos y menos permeables<sup>120</sup>. La albúmina genera fibras con una estructura más porosa, con mayor relación masa/largo de las fibras ( $\mu$ ), a pesar de que se asocia a fibras individualmente más gruesas<sup>110</sup>. La presencia de inmunoglobulinas modifica la estructura de la fibrina, en igualdad de las demás condiciones experimentales.

La fibronectina no perturba la polimerización ni la gelación del Fbg. Provoca cadenas más anchas cuando se incorpora durante la formación de la fibrina, conduciendo a geles más turbios y menos permeables. La fibronectina también puede incorporarse a geles ya formados y entrecruzados, sugiriendo que sus sitios de unión a la fibrina son diferentes de los sitios donde actúa el FXIII<sup>121</sup>.

Se han buscado diferencias en las propiedades de la fibrina que pudieran explicar la causa de diversos cuadros clínicos. Muchos de los estudios de las



disfibrinogenemias se basan en la evaluación de la estructura, permeabilidad, rigidez y lisabilidad de la fibrina. Los estudios de las disfibrinogenemias asociadas a trastornos hemorrágicos<sup>122,123</sup> y trombóticos<sup>124</sup> han permitido explicar la relación estructura-función de los distintos aminoácidos del Fbg, es decir como influye la acción de un aminoácido en la formación de la fibrina resultante.

Se han utilizado propiedades de la fibrina para proponer mecanismos que permitieran orientar la búsqueda de nuevos factores asociados a eventos aterotrombóticos. Se ha reportado la formación de geles de fibrina rígidos y de estructura compacta obtenidos con el plasma de pacientes jóvenes que han sufrido infarto de miocardio<sup>125</sup> y en pacientes que tuvieron complicaciones durante una operación de *bypass* cardiopulmonar<sup>126</sup>.

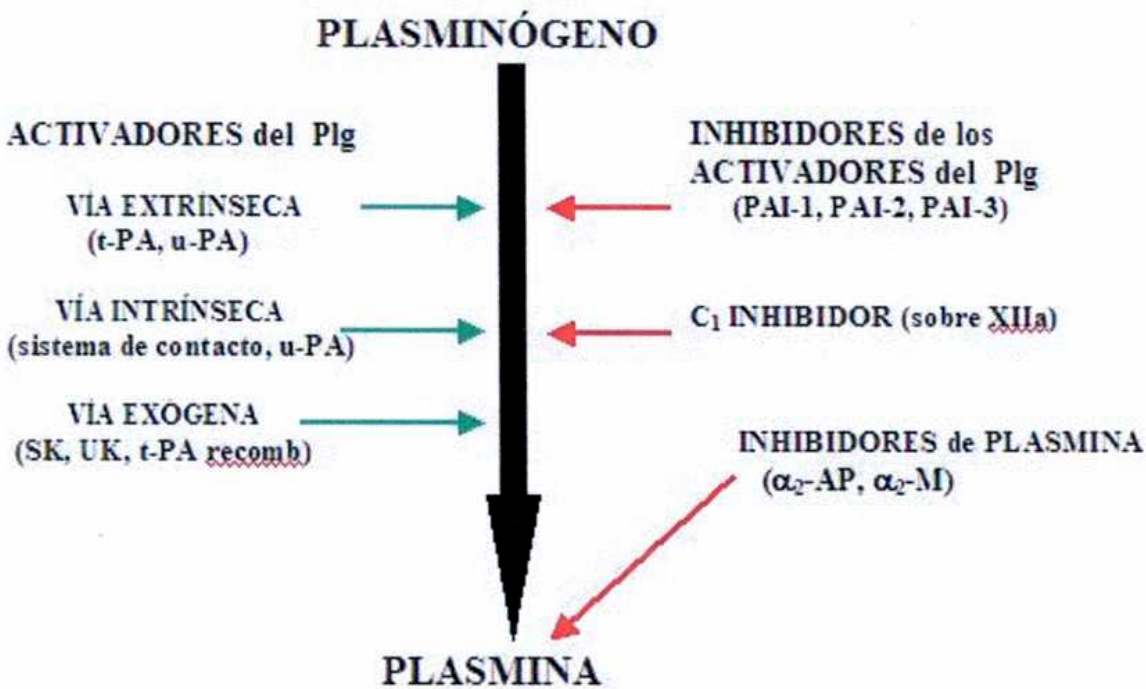
## EL SISTEMA PLASMINÓGENO-PLASMINA

Una vez que se formó el tapón hemostático, comienzan los procesos de reparación tisular y en forma lenta, el sistema fibrinolítico actúa controladamente para disolver el trombo formado. En condiciones normales la fibrinólisis es un proceso localizado y limitado, que lleva a la disolución del coágulo sin riesgo de proteólisis generalizada. Implica la degradación de fibrina catalizada por proteasas. Estas enzimas circulan como zimógenos, (sin actividad) y es imprescindible su activación para ejercer su función. Por lo tanto la fibrinólisis es interpretada como la activación de zimógenos y la disolución de fibrina. La interacción dinámica entre los mecanismos de coagulación y fibrinólisis permite un eficaz control de los sangrados y evita el depósito indeseado de fibrina. La activación o inhibición patológica de la fibrinólisis desemboca en trastornos hemorrágicos o trombóticos<sup>127</sup>.

### **PLASMINA**

A pesar de que hay varias proteasas con la capacidad de degradar fibrina (como tripsina, elastasa, catepsina G, metaloproteinasas de la matriz extracelular), la plasmina es considerada la principal enzima fibrinolítica. Es una serinoproteasa que hidroliza fibrina y otras proteínas como Fbg, FV, FVIII, componentes del sistema de complemento, etc. Interviene en una serie de procesos biológicos: activa metaloproteinasas e interviene en proteólisis pericelular, procesos relacionados con ovulación, reparación tisular, angiogénesis y en trastornos proliferativos.

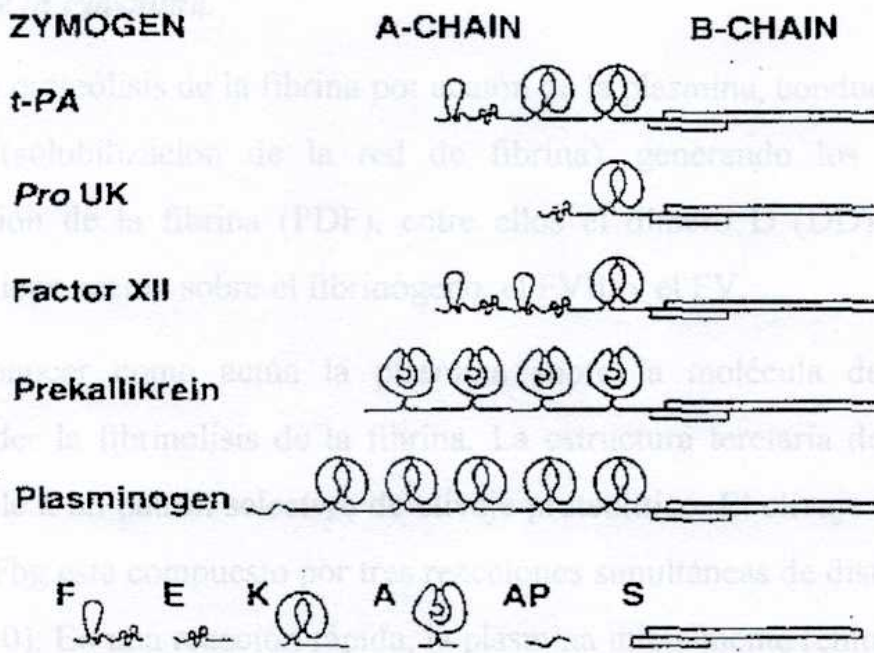
Su precursor es el plasminógeno (Plg), zimógeno que es activado a plasmina por la acción de activadores del plasminógeno (PA) (Figura 8). Hay 3 vías de activación *in vivo*: la intrínseca, la extrínseca y la exógena. El sistema está regulado a distintos niveles por la  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP), los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI) y el inhibidor de la fibrinólisis activable por Trb (TAFI)<sup>128</sup>, entre otros (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema del Sistema Plasminógeno – Plasmina

Los principales componentes del sistema fibrinolítico contienen dominios comunes en su estructura. En la Figura 9 se muestran algunas de ellas para asociar la estructura de la molécula portadora con su función <sup>129</sup>.

Una estructura muy frecuente son los dominios *kringle* (K). Son porciones de 80-85 aminoácidos que forman tres  $\beta$  trenzas perpendiculares que median uniones proteína-proteína o proteína-célula. Pueden contener sitios que unen ligandos análogos a lisina (lysine binding sites o LBS) de distinta afinidad. Los sitios LBS son depresiones hidrofóbicas formadas por residuos aromáticos cargados aniónicamente, que interactúan con otras proteínas, como fibrina,  $\alpha_2$ -AP, etc <sup>129</sup>.



**Figura 9:** Estructura presentes en algunas serinoproteasas.

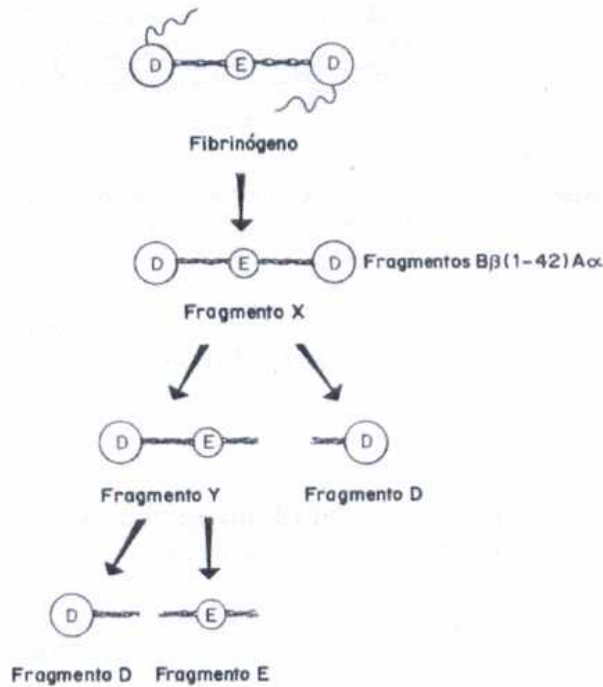
Estos zimógenos de una cadena, presentan una porción proteolítica (S) que por clivaje genera una molécula de dos cadenas unidas por puentes disulfuro y exponen su sitio activo. El sitio activo está formado por tres aminoácidos (generalmente Histidina- Aspártico- Serina) separados en la secuencia proteica pero cercanos en la estructura espacial de la proteína.

Muchos compuestos contienen un péptido de activación en su molécula (AP en la figura) cuya pérdida genera compuestos más activos o con características diferentes, como afinidad, vida media, etc. Otras estructuras son el dominio *finger* (F), semejante a un dedo, que está también presente en la fibronectina; el dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF, denominado E en la figura) y el dominio "apple" (A) por su similitud a una manzana.

### ***Acción de la Plasmina.***

La proteólisis de la fibrina por acción de la plasmina, conduce a la lisis del coágulo (solubilización de la red de fibrina), generando los productos de degradación de la fibrina (PDF), entre ellos el dímero D (DD). La plasmina también tiene acción sobre el fibrinógeno, el FVIII y el FV.

Conocer como actúa la plasmina sobre la molécula de Fbg facilita comprender la fibrinólisis de la fibrina. La estructura terciaria del Fbg lo hace susceptible a un patrón selectivo de clivaje proteolítico. El clivaje de la plasmina sobre el Fbg está compuesto por tres reacciones simultáneas de distinta velocidad (Figura 10): En una reacción rápida, la plasmina inicialmente remueve la porción C-terminal de la cadena  $A\alpha$ . En una reacción más lenta, cliva los primeros 42 aminoácidos de la cadena  $B\beta$ , originando al fragmento coagulable X (PM entre 240 y 260 kD)<sup>84</sup>. En una reacción muy lenta corta la cadena  $\gamma$ . El fragmento X es luego clivado en una de las dos regiones coiled-coil, produciendo el fragmento D (PM aproximado 100 kD) y el fragmento Y (150 kD aproximadamente). El fragmento Y es entonces clivado en la región coiled-coil restante, produciendo un segundo fragmento D y el fragmento E (45 kD aproximadamente). Estos fragmentos son separables por cromatografía de intercambio iónico e inmunológicamente diferentes<sup>129</sup>.

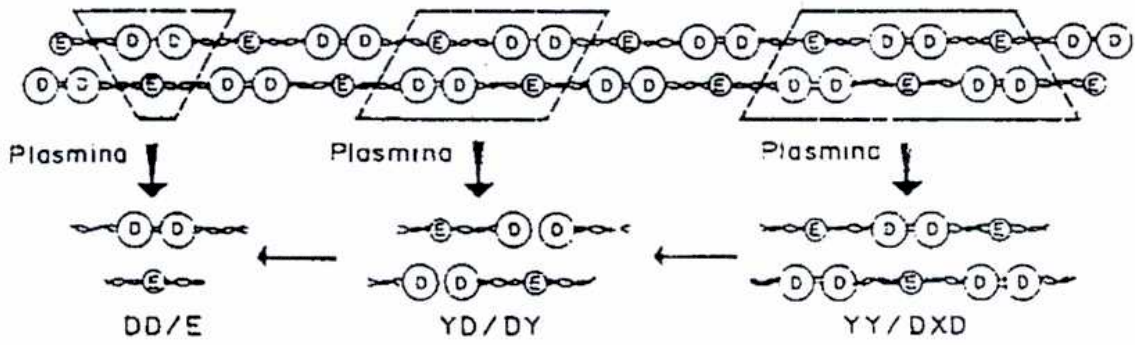


**Figura 10:** Acción de la plasmina sobre la molécula de fibrinógeno.

Normalmente, la plasmina no degrada Fbg, ya que los activadores de Plg no actúan en medio plasmático, sino sobre fibrina. Las pequeñas cantidades de plasmina que pudieran haberse formado, son rápidamente inhibidas por  $\alpha_2$ -AP.

La acción proteolítica de la plasmina sobre la fibrina conduce a la solubilización de la fibrina produciendo fragmentos de bajo peso molecular que incluyen en su mayoría a dos nódulos D entrecruzados por el FXIIIa, fragmento llamado dímero D. Como la plasmina no puede clivar los enlaces covalentes entre cadenas  $\gamma$ - $\gamma$  entrecruzadas, se producen fragmentos de distinto tamaño que contienen al dímero D. Los productos más frecuentes de la lisis de la fibrina son los mostrados en la Figura 11. La fibrina parcialmente degradada aumenta la activación de la fibrinólisis, retroalimentando al sistema<sup>130</sup>.

La plasmina cataliza el proceso de solubilización de la **fibrina** por corte transversal a través de los puentes de las protofibras más que por digestión progresiva desde afuera hacia las capas interiores de las fibras<sup>131</sup>.



**Figura 11:** Acción de la plasmina sobre la fibrina.

### **PLASMINÓGENO**

El precursor de la plasmina es el plasminógeno (Plg), glicoproteína inactiva (90 kD) de síntesis hepática, de una sola cadena que por la acción de activadores del plasminógeno, genera plasmina, enzima de dos cadenas unidas por puentes disulfuro. El Plg es el componente más abundante del sistema; su concentración es de 200 mg/ml mientras que la de la mayoría de los componentes es inferior a 0,05 mg/ml.

Desde el extremo N-terminal, la molécula de Plg está formada por (Figura 12): una región lineal de 80 aminoácidos, 5 dominios kringles (3 de ellos con sitios de unión a lisina o LBS), el enlace Arg 561- Valina 562 (que es clivado por los activadores del Plg originando plasmina) y el dominio serinoproteasa (sitio activo formado por la tríada catalítica Hist-Asp-Ser) en el extremo C terminal. La molécula de Plg se une a fibrina específicamente a través de los sitios LBS. A través de los mismos sitios se une además a  $\alpha_2$ -AP, receptores celulares de células endoteliales, leucocitos y plaquetas y a proteínas (como a glicoproteína rica en histidina, HRG). El 50% del Plg plasmático circula unido a la (HRG) formando un complejo equimolecular reversible<sup>132</sup>. La HRG compite por la fibrina, con los sitios LBS del Plg, lo que origina *in vitro* una menor activación de Plg a plasmina.

La unión de Plg a proteínas como trombospondina y tetranectina le inducen cambios conformacionales que causan la exposición del enlace Arginina<sub>561</sub>-Valina<sub>562</sub> que aumentan la velocidad de activación.

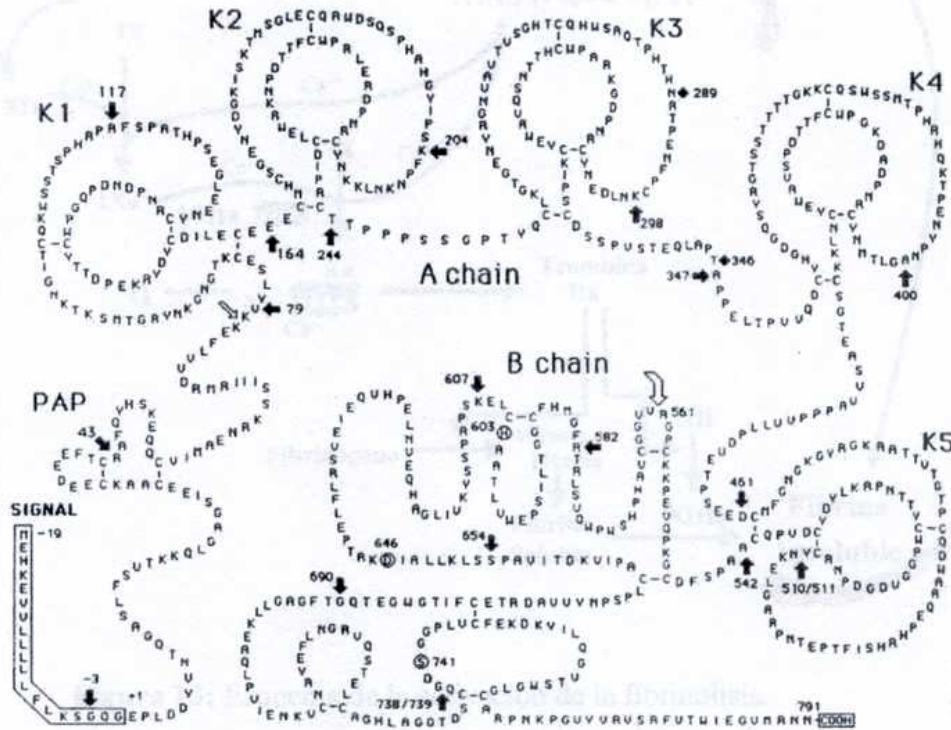
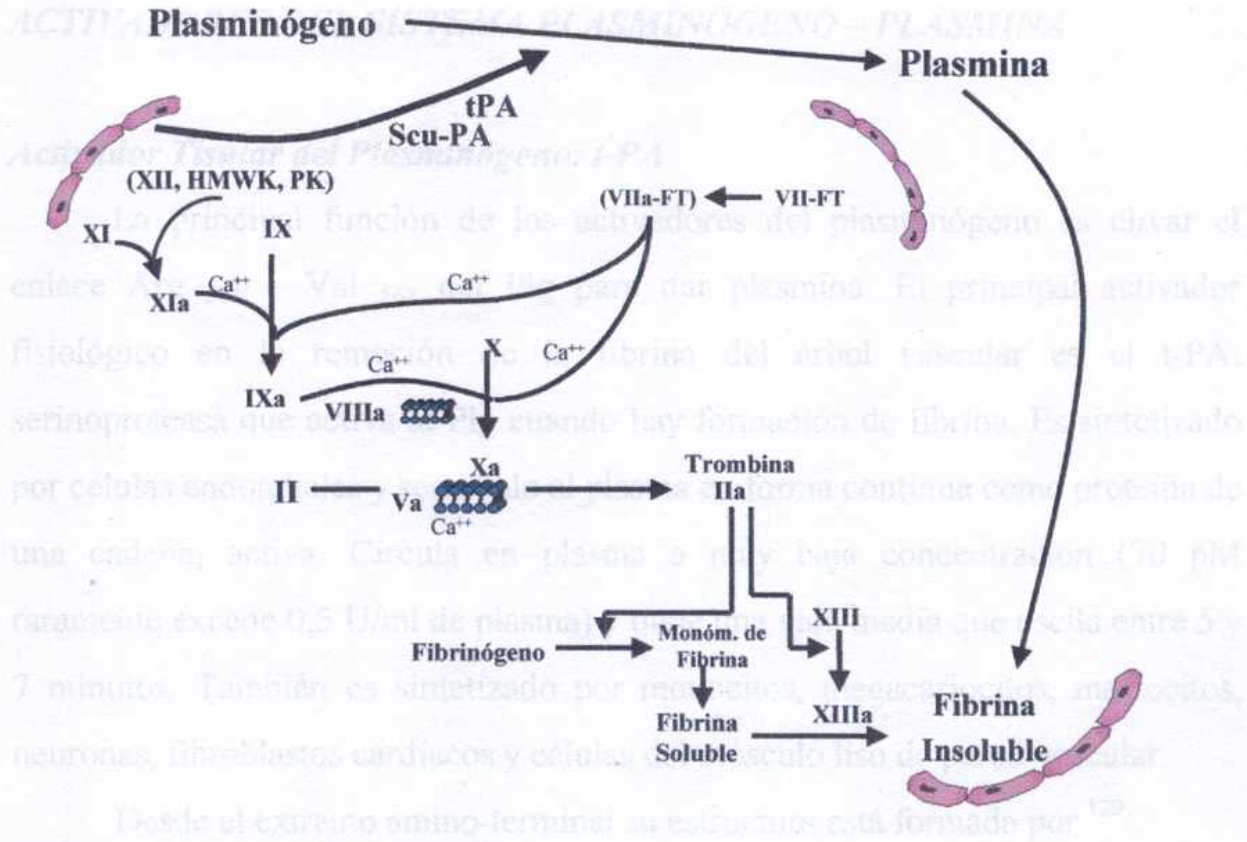


Figura 12: Esquema de la estructura del Plg.

La activación del Plg puede ocurrir por tres vías: la intrínseca, la extrínseca y la exógena (Figura 13). En la **intrínseca** participan los factores de la fase de contacto XIa, XIIa, calicreína y quininógenos de alto peso molecular (HMWK). Esta vía constituye sólo el 15 % del total de la actividad fibrinolítica

En la **vía extrínseca** participa el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el activador del plasminógeno de una sola cadena tipo urokinasa (scu-PA) y el u-PA de doble cadena; todos activan al plasminógeno, los primeros necesitan para lograr la activación superficies de fibrina y el último actúa en solución <sup>134</sup>.





**Figura 13:** Esquema de la activación de la fibrinólisis.

Los activadores del plasminógeno **exógenos** o agentes trombolíticos son: t-PA recombinante, UK y estreptoquinasa (SK). Esta última generada por los *Streptococos*  $\beta$ -hemolíticos, forma un complejo con el Plg en fase fluida que tiene actividad de plasmina<sup>135</sup>.

El t-PA es considerado el principal activador fisiológico del sistema fibrinolítico plasmático. La activación de Plg mediado por t-PA es catalizada por la fibrina (eleva su eficiencia al menos un orden de magnitud), lo cual permite: a) un incremento en la concentración local de Plg sobre la superficie de fibrina y b) una menor inactivación de la plasmina formada, por su principal inhibidor, la  $\alpha_2$ -AP.

El u-PA es considerado el principal activador del Plg en tejidos: se une al receptor celular para el activador de Plg tipo uroquinasa (u-PAR), participando así de los procesos proteolíticos pericelulares y de degradación de la matriz extracelular<sup>136</sup>.

## ACTIVADORES DEL SISTEMA PLASMINÓGENO – PLASMINA

### Activador Tisular del Plasminógeno: t-PA

La principal función de los activadores del plasminógeno es clivar el enlace Arg<sub>561</sub> – Val<sub>562</sub> del Plg para dar plasmina. El principal activador fisiológico en la remoción de la fibrina del árbol vascular es el t-PA: serinoproteasa que activa al Plg cuando hay formación de fibrina. Es sintetizado por células endoteliales y secretado al plasma en forma continua como proteína de una cadena, activa. Circula en plasma a muy baja concentración (70 pM raramente excede 0,5 U/ml de plasma) y tiene una vida media que oscila entre 5 y 7 minutos. También es sintetizado por monocitos, megacariocitos, mastocitos, neuronas, fibroblastos cardíacos y células del músculo liso de pared vascular.

Desde el extremo amino-terminal su estructura está formada por <sup>129</sup>:

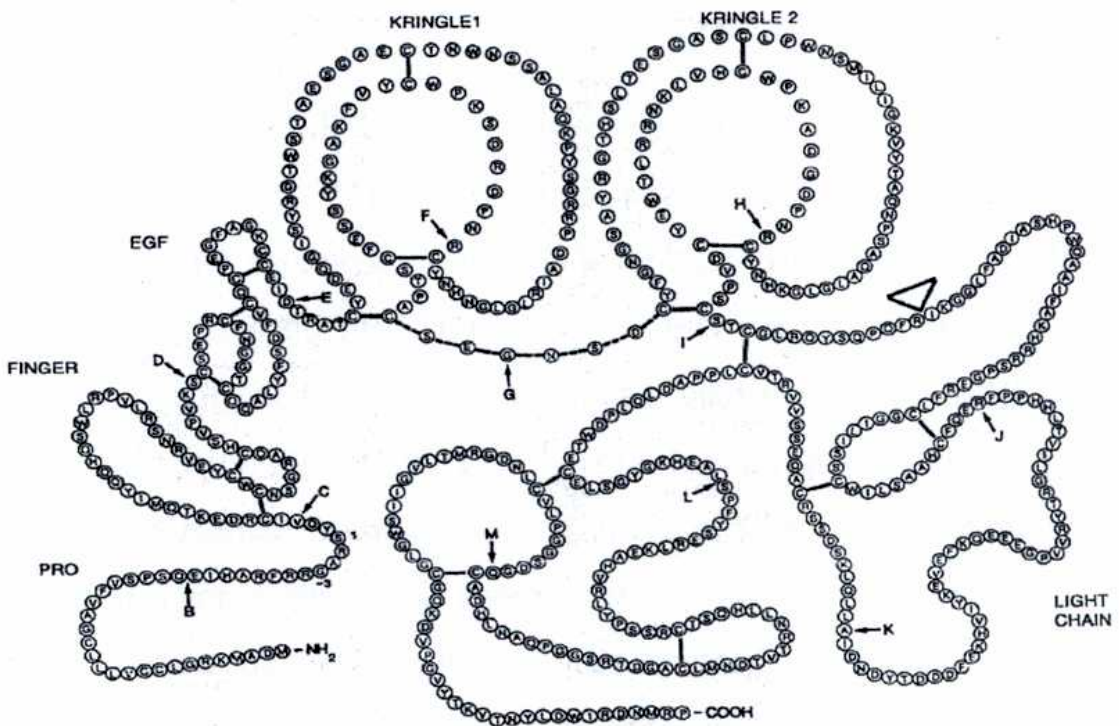


Figura 14: Esquema de la estructura del t-PA

- a) El residuo amino terminal de 20 a 23 aminoácidos, constituye un péptido señal típico requerido para la secreción de t-PA.
- b) Tiene un residuo en el extremo amino terminal homólogo al dominio finger de la fibronectina. Por este dominio el t-PA se une a fibrina.
- c) Le siguen dos residuos homólogos al dominio semejante al factor de crecimiento epidérmico (EGF like).
- d) Dos kringles semejantes a los del Plg (K<sub>I</sub> y K<sub>II</sub>). El K<sub>II</sub> tiene afinidad por lisina, fibrina y EACA.
- e) El enlace Arg<sub>275</sub> – Ileu<sub>276</sub> es cortado por plasmina y caliceína para dar t-PA de doble cadena (tct-PA) y actividad semejante al t-PA de una cadena pero que reacciona más rápido con sustrato cromogénico.
- f) Tríada catalítica His-Asp-Ser, responsable de la activación del Plg.

El t-PA se une a receptores específico (t-PAR) de la membrana plasmática de la célula endotelial, permitiendo una activación eficiente.

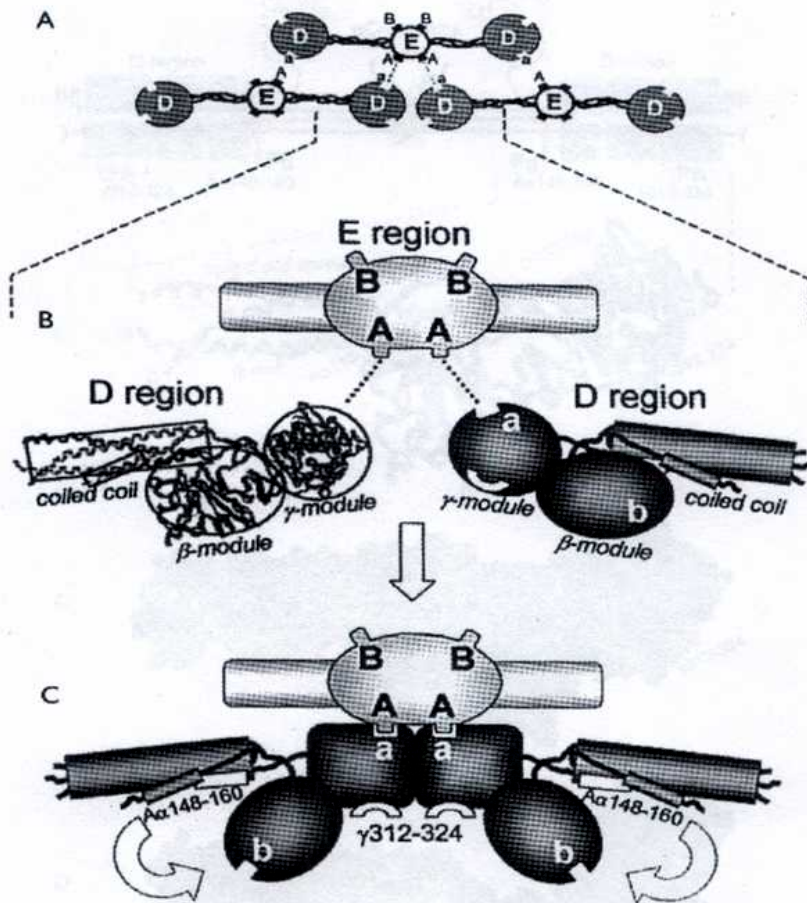
La mayor parte del t-PA está presente en un complejo inactivo, que forma con su inhibidor primario: PAI<sub>1</sub>. Su regulación se produce a tres niveles: i) la concentración de t-PA es mucho menor que la de Plg (15-85 pM vs. 1-2 μM), ii) existen tres inhibidores de t-PA: PAI<sub>1</sub>, PAI<sub>2</sub> y PAI<sub>3</sub>. Estas proteínas pueden circular libres o complejadas con otras proteínas como vitronectina o HGR. Su constante de asociación ( $K_{\text{asoc}} = 10^7\text{-}10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) indica que el t-PA libre, a la concentración plasmática, se compleja rápidamente con PAI. iii) La afinidad del t-PA por el PAI o por el Plg cambia enormemente en presencia de fibrina (400 a 1000 veces), de modo que genera plasmina más rápido a menor concentración de t-PA. La fibrina actúa como catalizador heterogéneo en la reacción de activación del Plg por t-PA y actúa como sustrato de la plasmina formada<sup>148</sup>.

### Mecanismo de activación del Plg por t-PA

El t-PA se une a la fibrina por el dominio finger y por el K<sub>II</sub>. El Plg se une a la fibrina a través de los sitios LBS del K<sub>V</sub>. Estas uniones aumentan la exposición de la unión Arg<sub>561</sub> – Val<sub>562</sub>, haciéndolo más susceptible a la activación. A medida que se forman nuevos sitios Lys C-terminal a través de los cuales la fibrina es degradada se une al t-PA y al Plg con mayor efectividad. La unión del t-PA y Plg a la fibrina favorece la activación del Plg que es catalizada por la fibrina. Esto permite aumentar la concentración de Plg sobre la superficie de fibrina, de modo que se forma plasmina unida a la fibrina, impidiendo la inactivación de la plasmina por la  $\alpha_2$ -AP. La vida media de la plasmina libre es de 0,15 segundos, mientras que si está unida a la fibrina es de 80 segundos. Por otra parte se activa más t-PA de una cadena por efecto de la plasmina formada.

Como se dijo anteriormente, la presencia de fibrina aumenta 1000 veces la baja activación de Plg por t-PA y protege a la plasmina de la inhibición por la  $\alpha_2$ -AP. No ocurre lo mismo con el fibrinógeno. Esto es fisiológicamente relevante ya que circunscribe la generación de la actividad fibrinolítica al lugar requerido: donde se encuentra el coágulo sanguíneo. Esta importante adaptación natural ocurre a través de un número de interacciones entre Plg, t-PA y fibrina (no con Fbg), iniciando la fibrinólisis en el lugar necesario<sup>87</sup>.

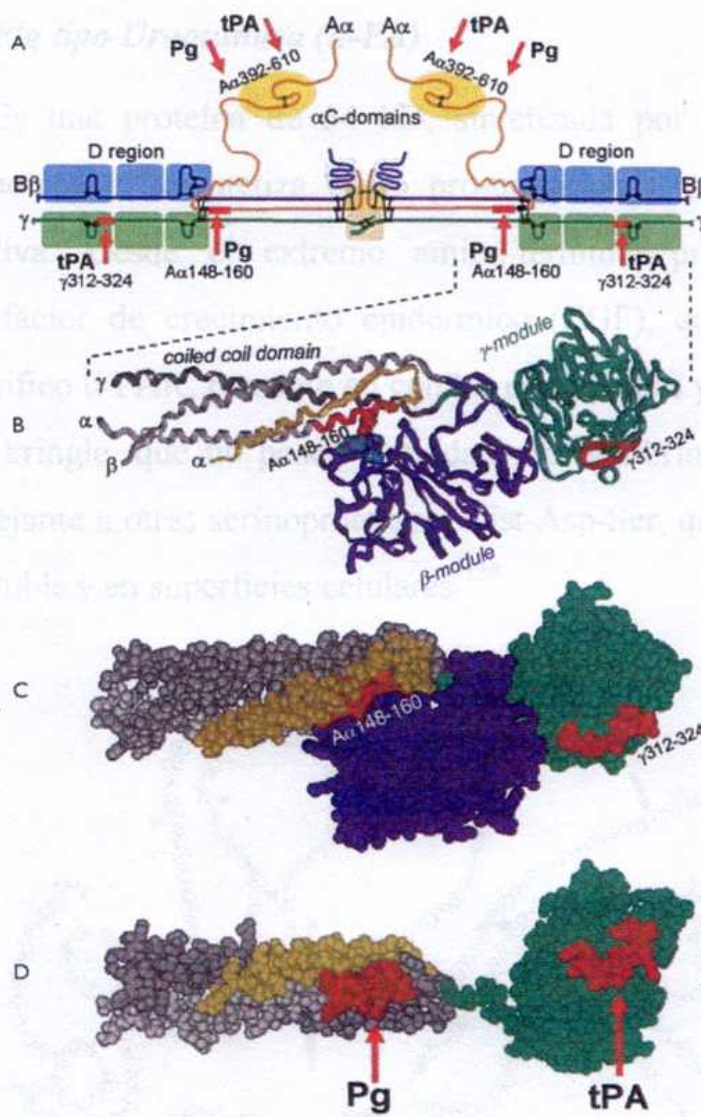
Luego de la remoción de EPA del Fbg, la interacción molecular entre el dímero D-E, a través de los sitios "a"-PA (Figura 15) que promueven la formación de protofibras, causan cambios conformacionales en el módulo  $\gamma$  de cada región D, provocando la exposición de un sitio criptico (oculto, región  $\gamma$  312-324) en el Fbg, que une t-PA. Estos cambios también causan la disociación del módulo  $\beta$  de la región *collar-coll*, el que permite acceder al sitio de unión al Plg (otro sitio criptico, en A $\alpha$  148-160).



**Figura 15:** Representación esquemática de la exposición de sitios críticos de las protofibras. A) Posición de los sitios críticos en la molécula de Fbg. B) y C) Dominio D

del Unión de Fbg y t-PA a los sitios críticos de la molécula de Fbg.

Luego de la remoción de FPA del Fbg, la interacción molecular entre el dímero D:E, a través de los sitios "a"-“A” (Figura 15) que promueven la formación de protofibras, causan cambios conformacionales en el módulo  $\gamma$  de cada región D, provocando la exposición de un sitio crítico (escondido, región  $\gamma$  312-324) en el Fbg, que une t-PA. Esos cambios también causan la disociación del módulo  $\beta$  de la región *coiled-coil*, el que permite acceder al sitio de unión al Plg (otro sitio crítico, en A $\alpha$  148-160).

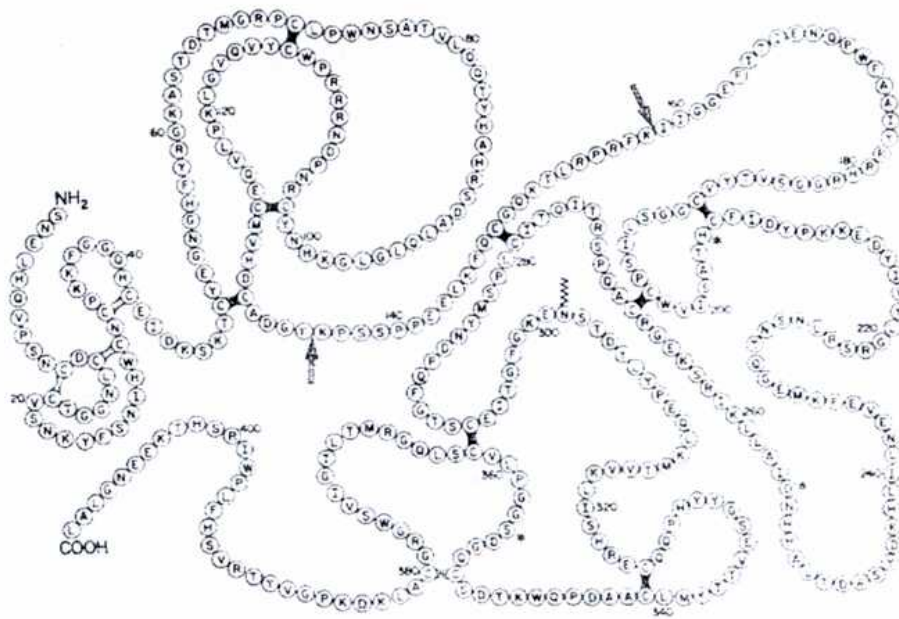


**Figura 16:** A) Posición de los sitios críticos en la molécula de Fbg. B) y C) Dominio D. D) Unión de Plg y t-PA a los sitios críticos de la molécula de Fbg.

La remoción del FPB, simultánea con la formación de las protofibras, también libera al dominio  $\alpha$ -C el que luego se disocia y expone la unión de alta afinidad del t-PA y Plg. La exposición de un sitio de alta afinidad en el dominio  $\alpha$ -C (dentro del residuo Aa 392-610) está probablemente, más relacionado con el cambio de una iteración intramolecular en el Fbg a una intermolecular en la fibrina<sup>87</sup>.

### Activador de Plg tipo Uroquinasa (u-PA)

Es una proteína de 54 kD, sintetizada por células endoteliales, renales y tumorales. Se sintetiza como pro-uroquinasa, proteína de una sola cadena, inactiva. Desde el extremo amino-terminal presenta un dominio semejante al factor de crecimiento epidérmico (EGF), que interactúa con el receptor específico u-PAR, presente en células endoteliales y plaquetas. Tiene un solo dominio kringle, que no posee actividad por la fibrina. Presenta la tríada catalítica semejante a otras serinoproteasas: Hist-Asp-Ser, que actúa activando al Plg en fase soluble y en superficies celulares<sup>138</sup>.



**Figura 17:** Esquema de la estructura de u-PA.

El enlace  $\text{lys}_{158}\text{-Ileu}_{159}$ , es cortado por una serie de proteínas (plasmina, tripsina, calicreina, FXIIa), generando una molécula activa de dos cadenas (tcu-PA) que participa en fibrinólisis soluble. Este corte puede ser producido en el entorno pericelular por distintas catepsinas y metaloproteinasas que activan u-PA y por consiguiente Plg en tejidos, participando en diversos procesos biológicos como ovulación, angiogénesis, reparación tisular, etc. La plasmina puede cortar el enlace  $\text{lys}_{135}\text{-lys}_{136}$ , generando u-PA de bajo peso molecular, activo. El u-PA puede ser activado por el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

(TAFI) que corta el enlace Arg<sub>156</sub>-Phe<sub>157</sub>, generando otra forma activa de alto peso molecular. El u-PA junto con el t-PA tienen actividad sinérgica para activar Plg<sup>138-139</sup>.

### **Agentes Trombolíticos**

Son sustancias usadas con fines terapéuticos que inducen la activación de Plg con el objeto de disolver el trombo obstructivo causante de la patología tratada, en menos tiempo que el fisiológico. Todos poseen alta afinidad para fibrina, aunque presentan diferente vida media y potencial trombolítico. Entre ellos podemos citar la **uroquinasa** (UK) y **estreptoquinasa** (SK, sintetizada por los Streptococos  $\beta$ -hemolíticos): ambas actúan en forma sistémica, degradando fibrina y otras proteínas como FVIII, FV, Fbg, FvW y componentes del complemento. La SK es altamente antigénica. Otras sustancias como la Staphiloquinasa, t-PA recombinante y u-PA recombinante tienen alta especificidad por fibrina y no degradan Fbg<sup>135</sup>.

Existen, además, agentes recombinantes quiméricos: son sustancias sintéticas que combinan la especificidad de fibrina de algunas especies, con la capacidad trombolítica de otras, intentando prolongar su vida media. No se han encontrado mutantes con mayor actividad fibrinolítica que el t-PA natural<sup>135 b</sup>.

### **INHIBIDORES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO**

La inhibición fisiológica del sistema fibrinolítico (Figura 18) ocurre a tres niveles: a) Inhibición de plasmina por  $\alpha_2$ -antiplasmina

b) Inhibición de los activadores del plasminógeno por el Inhibidor del Activador del Plg, tipo 1, 2 y 3 (PAI-1, PAI-2 y PAI-3).

c) Inhibición inespecífica de plasmina o de activadores del Plg.



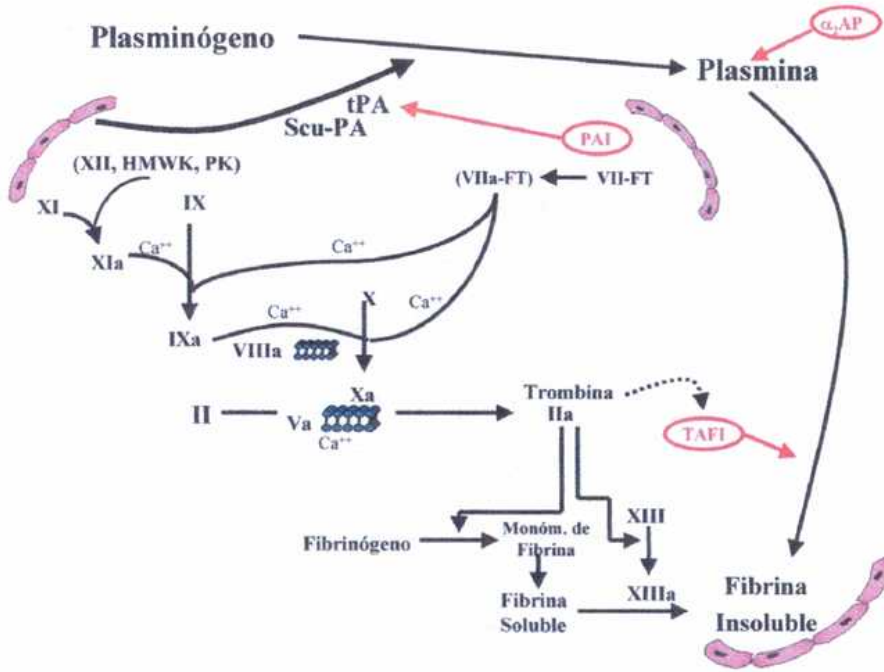
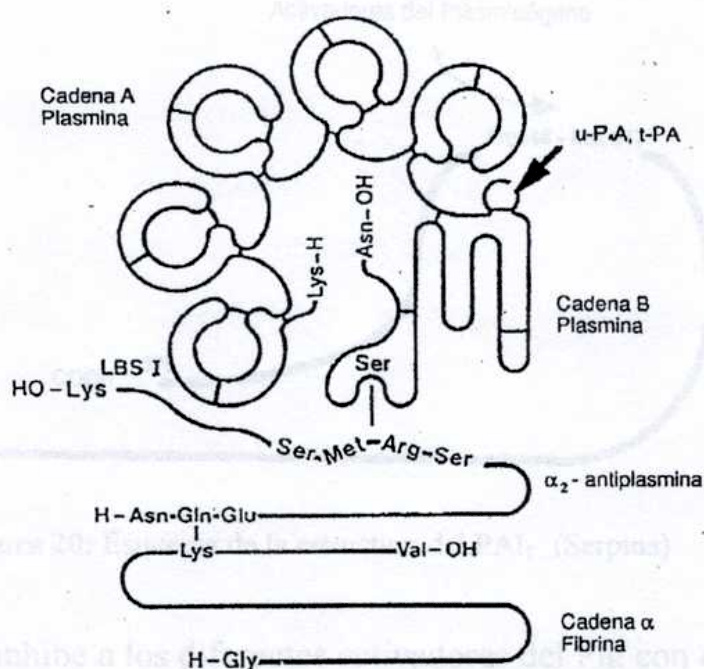


Figura 18: Esquema de inhibidores del Sistema Plg-Plasmina.

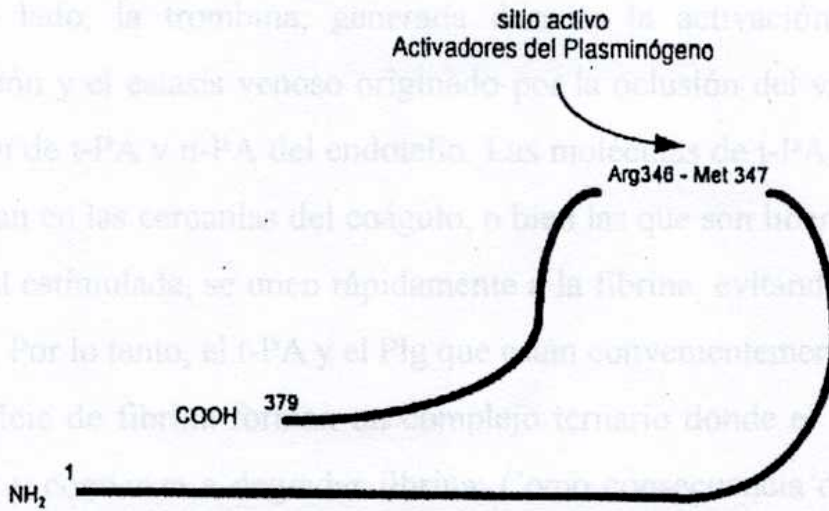
El principal inhibidor fisiológico de plasmina es  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP)<sup>129</sup> perteneciente a la familia de las serpinas (inhibidores de serinoproteasas). En plasma y en sistemas puros, la  $\alpha_2$ -AP forma un complejo equimolecular con la plasmina que no presenta actividad proteásica ni estearásica.

a) La **plasmina** libre es inhibida rápidamente por la  $\alpha_2$ -AP (Figura 19), en cambio cuando la plasmina es entrecruzada con la fibrina por acción del FXIIIa, el inhibidor atrapado en el coágulo es capaz de inhibir sólo la plasmina generada inicialmente en la superficie del mismo. La plasmina libre es rápidamente inhibida por  $\alpha_2$ -AP (el tiempo de vida media de la plasmina unida a fibrina es de 80 seg, mientras el de la plasmina libre 0.15 seg). La plasmina comenzaría a lisar el coágulo cuando se genera una cantidad de plasmina tal que supere la concentración del inhibidor presente en el trombo, lo cual permite la estabilidad del coágulo inicial<sup>129</sup>.



**Figura 19:** Esquema de Plasmina- $\alpha_2$ -AP-Fibrina.

b) El PAI-1 es el principal inhibidor fisiológico de los activadores del Plg: inhibe t-PA de una sola cadena, de dos cadenas y a scu-PA con quienes forma un complejo equimolecular estable. Es una glicoproteína que pertenece a la familia de las serpinas (inhibidores de serinoproteasas). Es producido por las células endoteliales, hepatocitos, adipocitos y liberado de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas durante la activación plaquetaria. Su sitio activo está localizado en los residuos Arg<sub>346</sub>-Met<sub>347</sub>, que bloquean al sitio activo de los activadores del Plg formando un complejo equimolecular estable. En condiciones normales su concentración es baja, pero aumenta en procesos inflamatorios. Circula en plasma unido vitronectina la que estabiliza la forma activa del inhibidor, incrementando ocho veces su tiempo de vida media y localizando al inhibidor en los diversos tejidos



**Figura 20:** Esquema de la estructura del PAI<sub>1</sub> (Serpina)

El PAI-2 inhibe a los diferentes activadores del Plg con distinta velocidad. Su concentración es detectable sólo en el tercer trimestre del embarazo. Está almacenado intracelularmente, constituyendo la reserva de actividad antifibrinolítica. El PAI-3 inhibe PCA y tcu-PA lentamente.

c) Existen una serie de proteínas que actúan como inhibidores de proteasas de amplio espectro o inespecíficos pero que participan en la actividad fibrinolítica<sup>129</sup>. Entre ellos se encuentran la  $\alpha_2$ -macroglobulina, Proteasa Nexina I, glicoproteína rica en histidina, C1-inhibidor, etc.

En los casos de trombosis, como en infarto agudo de miocardio, se ha detectado aumento de la concentración de PAI (por ser reactante de fase aguda) y disminución de la liberación de t-PA, inhibiendo el proceso fibrinolítico. No se ha detectado aumento de  $\alpha_2$ -AP.

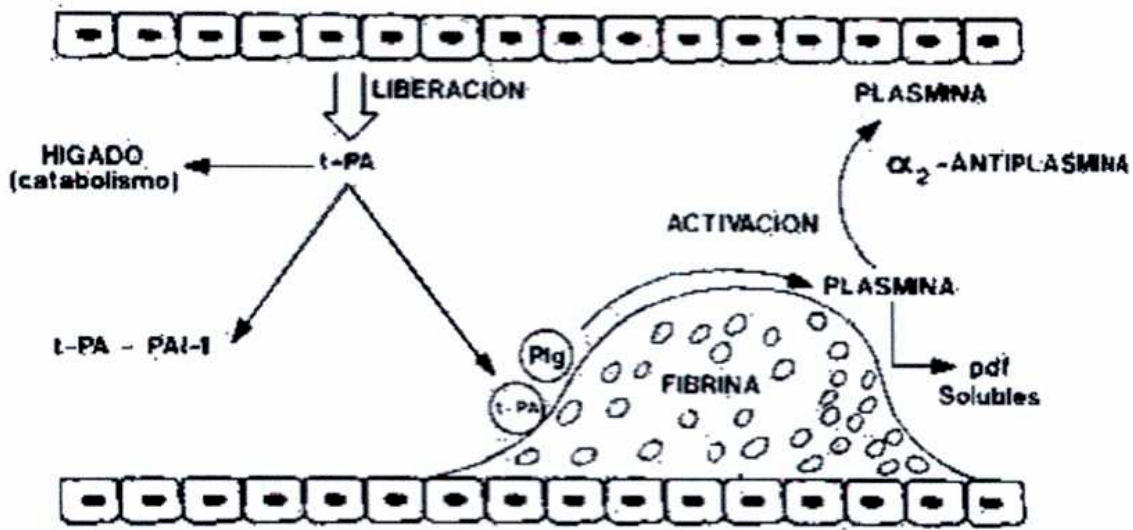
### ***FISIOLOGÍA DE LA LISIS DEL COÁGULO***

Durante la formación del coágulo, el t-PA y el Plg se adsorben a la fibrina. La  $\alpha_2$ -AP también se une a la fibrina, por acción del FXIIIa, asegurando la estabilidad del tapón hemostático, ya que la plasmina generada inicialmente es inhibida por la  $\alpha_2$ -AP entrecruzada. La lisis del coágulo comienza cuando la cantidad de plasmina supera la concentración de  $\alpha_2$ -AP presente en el coágulo.

Por otro lado, la trombina, generada durante la activación del sistema de coagulación y el estasis venoso originado por la oclusión del vaso, inducirían la liberación de t-PA y u-PA del endotelio. Las moléculas de t-PA circulante que se encuentran en las cercanías del coágulo, o bien las que son liberadas por la célula endotelial estimulada, se unen rápidamente a la fibrina, evitando ser inhibida por el PAI-1. Por lo tanto, el t-PA y el Plg que están convenientemente ubicados sobre la superficie de fibrina forman un complejo ternario donde el Plg es activado a plasmina y comienza a degradar fibrina. Como consecuencia de esta proteólisis inicial se expondrían sitios adicionales de alta afinidad (sitios lisina carboxiterminal), para la unión de más Plg. Este mecanismo constituye un “*feed back*” positivo para el sistema fibrinolítico y asegura la activación del Plg localizado sobre el coágulo de fibrina. A medida que transcurre la degradación del trombo, la plasmina es liberada al plasma e inmediatamente inhibida por  $\alpha_2$ -AP<sup>143</sup>.

En un sistema *in vivo*, la velocidad de la lisis del coágulo depende de la concentración de los agentes fibrinolíticos en la malla de fibrina, de su estructura, o sea del ancho y rigidez de las fibras que la componen y de la localización del coágulo en el sistema vascular<sup>144</sup>.

Posiblemente, la función de las enzimas fibrinolíticas no es únicamente la solubilización de la fibrina, sino un rol más general en la remoción de proteínas dañadas o innecesarias mediante la activación de metaloproteinasas de la matriz o la digestión de tejido extracelular<sup>145</sup>.



**Figura 21:** Fisiología de la lisis del coágulo

Los componentes celulares del trombo introducen más complejidad al proceso fibrinolítico. Cuando las plaquetas son activadas liberan PAI-1 y trombospondina y presentan una superficie fosfolipídica donde ocurren procesos de coagulación. Estas sustancias son inhibitorias para la fibrinólisis: el PAI-1 inhibe la activación de Plg. Los fosfolípidos impiden la actividad de plasmina en sustrato de fibrina y dificultan su difusión en la red; la trombospondina inhibe la activación de Plg y la actividad de plasmina. La liberación de elastasa y catepsina G de los polimorfonucleares puede compensar, al menos parcialmente, el deterioro de la fibrinólisis y puede representar un sistema auxiliar para la disolución del coágulo bajo condiciones fisiológicas<sup>146</sup>.

La célula endotelial, como se dijo, participa activamente en la regulación del sistema fibrinolítico, porque sintetiza y secreta t-PA y PAI, tiene receptores para estas proteínas y también para u-PA y Plg. El Plg unido a la célula se activa más rápidamente a plasmina y es menos neutralizado por  $\alpha_2$ -AP que cuando está en solución. Distintas proteínas de la membrana endotelial son receptores para componentes fibrinolíticos: la vitronectina une PAI<sub>1</sub> y a la vez une t-PA. La anexina II, otra proteína de la superficie endotelial, une t-PA y Plg en forma no competitiva, mientras que la tubulina une ambas proteínas competitivamente<sup>147</sup>.

### **FIBRINA: COFACTOR DE LA ACTIVIDAD LÍTICA**

La fibrina juega una importante función de cofactor, modulando la acción de trombina, plasminógeno-plasmina, t-PA,  $\alpha_2$ -antiplasmina y FXIIIa dentro del coágulo. Cuando la trombina está unida a la fibrina, no puede ser inhibida por ATIII ni por el complejo ATIII-heparina<sup>83</sup>. Por lo tanto permanece activa y puede cumplir un rol en la propagación de la fibrina y la activación del FXIII.

El haz de fibrina está constituido por varias cadenas del polímero, entrecruzadas covalentemente por el FXIIIa, por lo tanto expone los residuos lisina presentes en la parte exterior del haz. A través de esos residuos la fibrina fija  $\alpha_2$ -AP, Plg y t-PA, de modo que se genera plasmina. Cuando la concentración de plasmina supera a la de  $\alpha_2$ -AP, comienza la degradación de la fibrina. La fibrina parcialmente degradada expone más residuos lisina, que unirán más Plg y t-PA, retroalimentando la fibrinólisis.

El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) modula directamente la actividad de plasmina. Muchos factores pueden producir modificaciones conformacionales del Plg y/o del t-PA, modulando la actividad fibrinolítica<sup>129</sup>.

La acción de la plasmina sobre la fibrina y la activación del Plg mediada por los activadores fisiológicos dependen de la estructura de la red de fibrina<sup>148,149</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que redes con una arquitectura gruesa son más rápidamente lisadas por plasmina. Geles de fibrina con baja densidad de fibras son disueltos más rápido que los geles compactos<sup>122</sup>, posiblemente porque en estos últimos está dificultado el transporte de los componentes fibrinolíticos dentro del coágulo<sup>150</sup>. Sin embargo dentro de un mismo gel la desaparición de las fibras delgadas ocurre antes que la de las fibras gruesas<sup>151</sup>.

Como puede verse, son numerosos los factores que influyen sobre la estructura de redes de fibrina y su lisis. Usualmente las fibras delgadas se asocian con una arquitectura compacta, de porosidad disminuida y fibras gruesas con estructura abierta. Por lo tanto el comportamiento fibrinolítico es difícil de predecir. Por ejemplo, en hipoalbuminemia nefrótica la fibrina está formada por fibras delgadas; esto haría esperar una fibrinólisis acelerada respecto a la de individuos normales. Sin embargo su lisis está dificultada, tal vez por la disminución del poro del gel.

La permeabilidad es un factor decisivo en la velocidad de fibrinólisis. Se ha reportado que la fibrina menos permeable, formada por fibras gruesas, como la que se produce en pacientes diabéticos, son más resistentes a la lisis<sup>118</sup>, aún utilizando altas concentraciones de Plg.

Sabovic y Blinc reportaron<sup>152</sup> que coágulos sanguíneos retraídos *in vitro*, pierden el 94% de su contenido de plasminógeno y resultan resistentes a la lisis. Además, informaron que el transporte de Plg y activadores del Plg en condiciones de permeación o flujo a través del coágulo, aumentó la velocidad de lisis aproximadamente 100 veces comparado con el transporte por difusión. Sus resultados muestran que la lisis avanza generando un canal en forma axial, indicando que la velocidad de flujo es mayor en el centro que contra las paredes del tubo que contiene a la fibrina. Extrapolando a lo que ocurriría *in vivo*, estos datos indican que la lisis necesaria es aquella que facilita la reperfusión (recuperación del tránsito sanguíneo fuera del coágulo) y que el mismo flujo sanguíneo provocará, de manera más lenta, la lisis de la porción adherida a la pared vascular. Uno de los aspectos estudiados fue el tiempo de lisis en relación al diámetro de la sección de una fibra: el tiempo de lisis de fibras cuyo diámetro promedio era mayor que 450 nm fue  $7,6 \pm 3,7$  min, mientras que con un diámetro menor a 200 nm fue  $6,4 \pm 4,2$  min.

Podría considerarse que las fibras gruesas de la fibrina exponen más sitios de unión a los componentes del sistema fibrinolítico que las finas, actuando como

reservorio del Plg atrapado durante la polimerización. Esta mayor concentración de Plg haría a las fibras más rápidamente lisables. Tal vez por esta causa los autores han reportado que las fibras gruesas resultan mejor cofactor para el t-PA

153

La localización del trombo crea variables hemodinámicas que influyen en la velocidad de fibrinólisis. Un trombo que obstruye una pequeña rama de una arteria cercana a un punto de bifurcación, está expuesto a altas presiones comparado con un trombo localizado en una vena distal. La diferente localización del trombo hace que las moléculas penetren por dos mecanismos: **perfusión** o **difusión** dependiendo de la presión en la superficie del trombo. La perfusión es el mecanismo mediante el cual los componentes fibrinolíticos atraviesan el coágulo por efecto de la presión arterial. Mientras que la difusión es un proceso que resulta de una diferencia de concentraciones. La difusión de moléculas del tamaño de enzimas fibrinolíticas (aproximadamente 5 nm) es bastante baja (1 cm del gel en 10 días). El tamaño del poro del gel de fibrina varía aproximadamente de 0,1  $\mu\text{m}$  en geles apretados, a 5  $\mu\text{m}$  en geles laxos. El tiempo de disolución del coágulo en el compartimento vascular, a idéntica concentración de enzimas fibrinolíticas y zimógenos, variará mucho dependiendo de las condiciones de flujo. La permeación a causa de la presión acelera la llegada de t-PA, u-Pa y plasmina en un factor de 50, 25 y 10 respectivamente.

Si el coágulo de fibrina está sometido a baja presión, su lisis está controlada por un proceso difusivo, que dependerá del tamaño de la red de fibrina y de las propiedades de los componentes involucrados, como su coeficiente de difusión, concentración, afinidad por la fibrina, etc. Si el coágulo está sometido a alta presión, su lisis dependerá principalmente de la permeabilidad de la fibrina, que regulará la velocidad de flujo dentro del coágulo y por lo tanto la de la llegada de activadores del Plg hasta su sustrato en puntos interiores del gel, generando otros centros de lisis. Sin embargo no se vieron diferencias entre la lisis de geles gruesos y finos cuando se utilizaron altas concentraciones de



plasmina o u-PA, en condiciones de permeación <sup>144</sup>.

Además, la generación de plasmina sobre la fibrina está limitada por la baja concentración de t-PA plasmático. Serán pocos los sitios donde se genere plasmina a partir del complejo ternario t-PA-fibrina-Plg. El t-PA circulante deberá penetrar a través del gel para que éste se vaya disolviendo. Por lo tanto, la permeabilidad reducida de estos geles dificultaría la llegada del t-PA, demorando la velocidad del frente de lisis. El fenómeno de transporte tiene un impacto importante sobre la velocidad a la cual el coágulo se disuelve. Es de esperar que el agente trombolítico (plasmina, u-PA, t-PA) sea entregado dentro del coágulo más eficientemente por permeación que por mecanismo de difusión. Wu y colaboradores <sup>144</sup> han desarrollado experimentos controlando las condiciones de perfusión de agentes líticos dentro de geles de fibrina gruesos y finos, demostrando 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.

### ***MECANISMOS ATEROTROMBÓTICOS DE LA HOMOCISTEÍNA***

Se han realizado numerosos estudios *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que vinculan a la HHcy con la enfermedad aterotrombótica.

Se ha demostrado que la oxidación de la Hcy genera especies oxigenadas, altamente reactivas (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxido) que inducirían injuria endotelial <sup>154</sup>. Estas especies serían, además, responsables de la peroxidación lipídica y oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contribuyendo a la formación de las placas de ateroma <sup>155</sup>.

Concentraciones elevadas de Hcy afectarían la actividad de diversas enzimas. La HHcy disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa (enzima que cataboliza especies oxigenadas) causando la acumulación de sustancias tóxicas <sup>156</sup>. Además, reduce la expresión y secreción de la superóxido dismutasa,

contribuyendo al daño oxidativo <sup>157</sup>. Por otra parte, produce hipometilación, ya que afecta enzimas que catalizan la transferencia de grupos metilos a diversos aceptores como proteínas, lípidos, DNA, etc, relacionada con la alteración en la reparación de proteínas dañadas, crecimiento normal de la célula endotelial y muchas otras funciones celulares <sup>158,159</sup>.

Se ha sugerido que la HHcy disminuiría la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), afectando la vasodilatación del endotelio <sup>160</sup>.

También se ha planteado que la Hcy también podría afectar las propiedades elásticas de la pared arterial por el aumento en la síntesis de las fibras de colágeno y la alteración del entrecruzamiento de las mismas <sup>161</sup>.

Se ha demostrado que la HHcy también ha afectado el sistema hemostático, contribuyendo al desarrollo de un estado protrombótico. En particular, frente a una injuria vascular, se exponen los componentes de la matriz subendotelial, activando a las plaquetas y conduciendo a la formación del trombo.

Los estudios plaquetarios realizados en pacientes con HHcy son contradictorios. La Hcy *in vitro* no modificó la agregación plaquetaria por efecto de diferentes inductores <sup>14</sup>.

Con respecto al sistema de coagulación, se sugiere un estado hipercoagulable en los pacientes homocistinúricos a causa del aumento significativo de marcadores de activación (como complejo Trb-AT y fragmentos de la protrombina 1+2) y la disminución de inhibidores fisiológicos de la coagulación (como AT y PC). Se ha reportado que niveles elevados de Hcy modifican al FVa inhibiendo su clivaje por PC activada <sup>162</sup>. La Hcy no ejerce su efecto protrombótico a través de la PC <sup>163</sup>, pero reduce los puentes disulfuro de la TM, disminuyendo la formación del complejo TM-Trb que activa a la PC.

Los resultados del efecto de la HHcy sobre la actividad de los factores de coagulación son contradictorios. Algunos autores demuestran una fuerte asociación entre la HHcy y la concentración de Fbg <sup>164</sup> mientras que otros no la

hallaron <sup>165</sup>. En estudios *in vitro* y *ex vivo*, Quintana <sup>14</sup> no halló evidencias para asociar los niveles de HHcy con alteraciones de la actividad de los factores de coagulación. Recientemente se ha reportado <sup>166</sup> que la HHcy incrementó la velocidad de coagulación, disminuyó la funcionalidad de la vía de contacto, la de FXII, FX y FII y disminuyó la actividad fibrinolítica.

Los resultados sobre el sistema fibrinolítico también son contradictorios. Por un lado, se ha reportado una disminución importante en la actividad del t-PA <sup>167</sup> y del PAI <sup>168</sup>. Por otro lado, no se ha alterado la capacidad fibrinolítica en pacientes HHcy, con infarto de miocardio reciente <sup>169</sup>.

Se ha reportado que la HHcy puede vincular la nefropatía diabética con inflamación e hipercoagulabilidad, aumentando el riesgo cardiovascular <sup>170</sup>. La red de fibrina muy compacta dificulta el transporte de los componentes fibrinolíticos, disminuyendo la actividad lítica.

Se evaluaron sustancias que pudieran resultar marcadores útiles en la prevención de complicaciones hemorrágicas frente a un tratamiento trombolítico. Los valores de Hcy correlacionaron con el recuento plaquetario, reafirmando que estaría vinculada a las alteraciones trombóticas. Pero no hubo diferencias entre la Hcy y las complicaciones hemorrágicas, sugiriendo que la Hcy no modificó la función fibrinolítica <sup>171</sup>.

Estudios *in vivo* <sup>172</sup> revelaron que la fibrina de plasmas de conejos HHcy mostraron una estructura empaquetada, compuesta por fibras delgadas y resistentes a la lisis por plasmina. Los autores proponen que la HHcy causaría una disfibrinogenemia adquirida (por entrecruzamiento del fibrinógeno a través de uniones disulfuro) conduciendo, a coágulos resistentes a la lisis y provocando simultáneamente, un defecto en la generación de plasmina.

A pesar de la extensa bibliografía que apoya la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva, no se ha llegado aún a un consenso sobre los principales mecanismos responsables de esta interacción. Trabajos previos de nuestro laboratorio detectaron cambios en las redes de fibrina por acción de la

---

Hcy. Estos hallazgos iniciaron una línea de investigación en el tema, diferente a la reportada internacionalmente. Los estudios publicados han evaluado la acción de la Hcy en los procesos **previos** a la generación del trombo; en cambio, en el presente trabajo de tesis se han investigado las **características fisicoquímicas** de las redes de fibrina y el proceso de lisis **posterior**.

## ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVO GENERAL**

Contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de los niveles elevados de Homocisteína con el riesgo de enfermedad vascular oclusiva, evaluando el efecto del aminoácido *in vitro* sobre la formación, propiedades y lisis de la fibrina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Optimizar métodos que permitan caracterizar cualitativa y cuantitativamente a la fibrina. En particular, implementar técnicas de microscopía electrónica, tromboelastografía, reometría y permeabilidad.
- ❖ Estudiar el efecto de la Hcy sobre distintas propiedades de la fibrina, evaluando:
  - cinética de formación
  - estructura
  - propiedades viscoelásticas
  - respuesta a grandes deformaciones
  - permeabilidad
  - lisabilidad
- ❖ Investigar cuál o cuáles de los componentes asociados a la fibrina estarían afectados por el aminoácido.
- ❖ Evaluar el efecto de la Hcy sobre el proceso fibrinolítico.
- ❖ Investigar el efecto de la Hcy sobre los principales componentes de la fibrinólisis: plasmina, plasminógeno y activadores del plasminógeno.

***MATERIALES Y MÉTODOS***

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS

En todos los estudios se utilizó una mezcla de plasmas citratados libres de plaquetas, provenientes de individuos normales. Se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 1,29 mM en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante; las muestras se sometieron a doble centrifugación (a  $2.500 \times g$  durante 10 minutos). La mezcla plasmática (*PN\**) fue alicuotada convenientemente y congelada a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Para realizar tromboelastogramas, se utilizaron muestras de sangre entera citratada de individuos cuyos valores hematimétricos, recuento plaquetario, tiempo de protombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activa (TTAP) y fibrinógeno se encontraban dentro del rango normal.

### DROGAS Y REACTIVOS QUÍMICOS

Para el desarrollo de los ensayos *in vitro* se utilizaron soluciones de: DL-homocisteína (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI, EEUU), Fbg humano, Fbg bovino, Trb bovina y azul brillante de Coomasie (Sigma Chemical St. Louis, MO, EEUU), concentrado de factor XIII humano (Fibrogammin P, Aventis Behring, Alemania), uroquinasa (Ukidan Serono, Aubonne, Suiza o UCB, Villa Guardia, Como, Italia). Plasminógeno, plasmina, y t-PA de origen humano (Chromogenix, Milán, Italia). Sustrato cromogénico para trombina (S2238) y plasmina (S2251) (Chromogenix, Milán, Italia), equipos Berichrom FXIII (Dade-Behring, Alemania).

El resto de los reactivos utilizados, detallados en cada experiencia, fueron de grado analítico.

*Buffer fosfato salino (PBS):* NaCl 137 mM, KCl 3mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  15 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM; pH 7,2).

*Buffer de Owren* (barbital sódico 0,028 M, NaCl 0,125 M, pH 7,35).



**Purificación de Plasminógeno:**

- *Buffer inicial* ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  0.1 M, EDTA 0,003M pH 7,4)
- *Buffer de elución* ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  0,1 M, EDTA 0,2 M, ácido  $\delta$ -aminocaproico pH 7,4)

*Buffer cacodilato* (Cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2-7,4).

*Buffer Tris - HCl* (Tris 50 mM NaCl 15 mM, ajustado a pH 8 con HCl)

**MÉTODOS****Cuantificación de la trombina.**

La actividad amidolítica de trombina se determinó por método crómogénico sobre el sustrato S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl; PM 625,6).

Se incuban (120 segundos exactos a 37°C) 100  $\mu\text{l}$  de diluciones de trombina (0 a 10 U/ml en buffer Tris-HCl o la muestra a dosar en dilución conveniente), con 100  $\mu\text{l}$  de S2238 (1 mM). La reacción se detiene con 100  $\mu\text{l}$  de ácido acético 50 % y se determina la liberación p-NA a 405 nm con un lector de ELISA (Reader 100, Organon Teknica, Miami, EE.UU.). La concentración de trombina de la muestra se extrapola de la curva de calibración<sup>173</sup>.

**Tiempo de trombina (TT)**

Esta técnica evalúa el proceso de fibrinoformación. Se mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una cantidad determinada de trombina<sup>174</sup> (la trombina corta las cadenas  $\text{A}\alpha$  y  $\text{B}\beta$  del Fbg).

Se incuban 100  $\mu\text{l}$  de plasma 2 minutos a 37 °C. Se agrega 50  $\mu\text{l}$  de una solución de trombina de 1,5 NIH/ml y se mide el tiempo de formación del coágulo de fibrina. Las determinaciones se realizaron en forma manual o utilizando un coagulómetro semiautomático ST4 (Diagnostica Stago, Francia).

### **Tiempo de Reptilase® (TR)**

Esta técnica evalúa el proceso de fibrinoformación con el extracto de *Bothrops atrox*, comercialmente conocido como *Reptilase®* o Batroxobin. Esta enzima cliva exclusivamente la cadena A $\alpha$  del Fbg. Se mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una cantidad determinada de *Reptilase®* (Stago).

Se incuban 150  $\mu$ l de plasma (o muestra con fibrinógeno) 2 minutos a 37°C. Se agregan 50  $\mu$ l de una solución de *Reptilase®* y se mide el tiempo que demora en aparecer el coágulo de fibrina<sup>175</sup>.

### **Cuantificación de Fibrinógeno**

Se utilizó el método funcional de Clauss<sup>176</sup>, basado en que el tiempo de coagulación de un plasma diluido en presencia de trombina en exceso, es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno del plasma.

Se realizan diluciones 1:5 y 1:10 del plasma o solución de Fbg a dosar, con *buffer* de Owren. Se incuban 100  $\mu$ l de dilución, de la muestra 2 minutos a 37 °C. Se agregan 50  $\mu$ l de una solución de trombina de 100 U/ml y se mide el tiempo que demora en aparecer el coágulo de fibrina.

Los resultados expresados en mg/dl, fueron calculados a partir de la curva de calibración realizada con diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40 del plasma de referencia.

Todas las determinaciones se realizaron en forma manual o con un coagulómetro semiautomático ST4 (Diagnostica Stago, Francia).

### **Purificación de Plasminógeno**

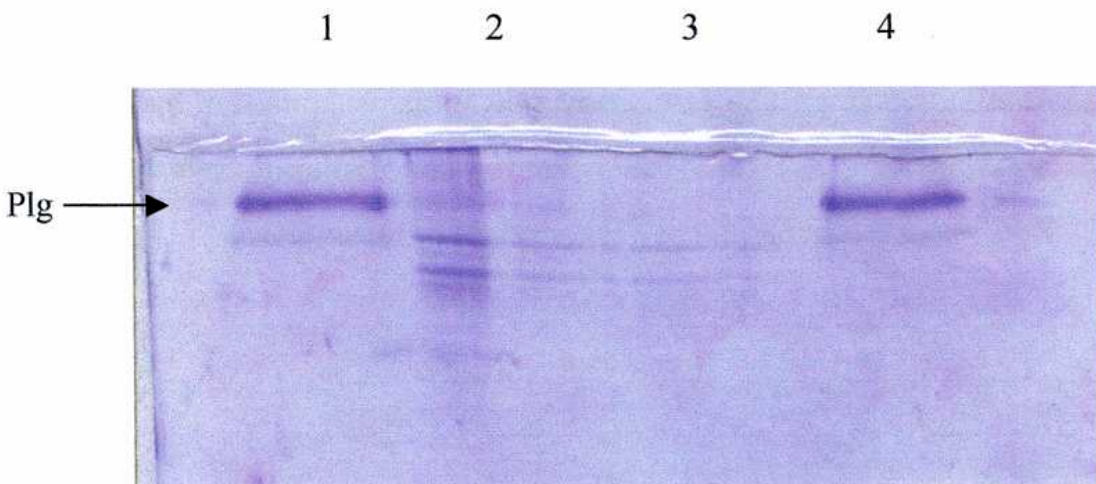
Se realizó la purificación de Plg humano a partir de plasma normal, por cromatografía de afinidad sobre lisina-sefarosa<sup>176</sup>.

Se empaquetaron columnas de 6 cm de largo x 0,8 cm<sup>2</sup> de sección con 1 g de lisina sefarosa equilibrada en *buffer* inicial. El plasminógeno se purificó a

partir de 10 ml de plasma humanos, obtenido por punción venosa, anticoagulado con citrato de sodio (1,29 mM). Se agregaron 8 ml de agua destilada y 0,002 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Esta mezcla se agrego a la columna, previamente equilibrada. Se recogió el filtrado en fracciones de 2 ml, a una velocidad de 4 gotas/minuto. Se lavó la columna con buffer hasta obtener un filtrado cuya absorbancia a 280 nm fue menor que 0,002. Finalmente se eluyó con buffer fosfato 0,1 M, EDTA 0,2 M, pH 7,4 que contenía ácido  $\delta$ -aminocaproico, registrando la absorbancia a 280 nm. En los tubos que presentaron mayor absorbancia se determinó la presencia de Plg por la técnica de Outcherlony con un antisuero policlonal antiplasminógeno humano. Se reunieron las fracciones que contenian Plg y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry y la actividad funcional del Plg por el método amidolítico sobre sustrato cromogénico S2251.

#### ***Identificación del Plasminógeno por Electroforesis.***

Se identificó el Plg por electroforesis en geles de poloacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) <sup>178</sup>. Se utilizó un gel de poliacrilamida (T: 10% p/v; C: 2% p/p). El desarrollo electroforético se realizó a 180 V, con una intensidad menor que 25 mA. Los geles se colorearon con azul brillante de Coomasie 5% <sup>178</sup>.



**Figura 22:** Electroforesis (SDS-PAGE) de fracciones eluidas de las columnas de lisina-sefarosa. Calles 1 y 4: fracciones con Plg, calles 2 y 3: marcadores de PM.

### **Cuantificación del Plasminógeno**

Se utilizó un método amidolítico que emplea estreptoquinasa (SK) para formar un complejo equimolecular con el plasminógeno, exponiendo su sitio activo. La actividad amidolítica del complejo se evidencia sobre el sustrato cromogénico S-2251 (H-D-Val-Phe-Lys-pNA.2HCL) liberando p-nitroanilina en forma directamente proporcional a la concentración de plasminógeno<sup>179</sup>.

Se incuban alícuotas de las fracciones eluidas (3 minutos a 37 °C), con SK (c.f. 1000 UI/ml) y sustrato cromogénico S-2251 (c.f. 2 mM) en *buffer* tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Se realiza una curva de calibración con diluciones de Plg de referencia estándar. La reacción se detiene con ácido acético 50 %, y se determina la liberación p-NA a 405 nm. La concentración de Plg de la muestra se extrapola de la curva de calibración.

### **Factor XIII**

La actividad del factor XIII se determinó por el método espectrofotométrico con reactivos Berichrom FXIII (Dade-Behring), utilizando un coagulómetro automático BCT (Dade-Behring M.G., Alemania). El FXIII contenido en la muestra es activado por trombina a FXIII $\alpha$ , el que acopla un sustrato peptídico específico al éster glicinoetílico, liberando amoníaco. La cantidad de NH<sub>3</sub> liberado se determina enzimáticamente con NADH y  $\alpha$ -cetoglutarato, midiendo en un espectrofotómetro el descenso de NADH a 340 nm. Por lo tanto, el consumo de NADH resulta proporcional a la actividad del factor XIII<sup>180</sup>.

## EVALUACIÓN DE GELES DE FIBRINA

Los efectos de la Hcy sobre la fibrina fueron evaluados mediante estudios cinéticos, microscopía electrónica, estudios reométricos, ensayos de permeabilidad, compactación y estudios líticos en diferentes sistemas. A pesar de las semejanzas, se describirán los detalles metodológicos utilizados en cada una de ellas.

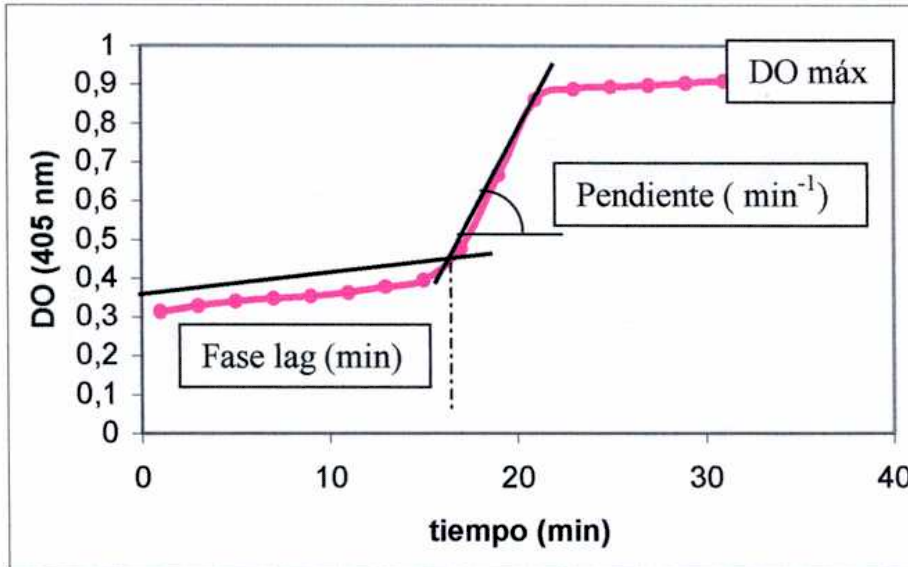
Alícuotas de *PN\** (detalle en Pág. 69), o soluciones de Fbg (c.f. 3 g/l) se incubaron separadamente (1 hora, a 37 °C) con soluciones de Hcy en la proporción 9 partes de *PN\** + 1 parte de solución de Hcy (c.f. = 500 µM u otra especificada en cada ensayo). La muestra control se obtuvo reemplazando igual volumen de solución de Hcy por solución fisiológica (SF).

A cada una de las muestras se agregó Trb bovina (c.f.= 0,05 U/ml u otra concentración especificada en cada ensayo) y CaCl<sub>2</sub> (c.f.= 33 mM), obteniéndose los geles de fibrina correspondientes en los diferentes soportes requeridos para cada técnica.

### *CINÉTICA DE FIBRINOFORMACIÓN.*

Una mezcla de CaCl<sub>2</sub> (c.f.= 33 mM) y Trb bovina (c.f.= 0,05 U/ml u otra especificada en cada ensayo), se colocó, por triplicado en policubetas de poliestireno. Se agregó la mezcla plasmática preincubada con Hcy o SF. Durante el proceso de coagulación, se registró la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de ELISA, cada 2 minutos hasta valor constante<sup>88</sup>. Estudios cinéticos con soluciones purificadas se realizaron en las mismas condiciones, reemplazando la mezcla plasmática por una solución de Fbg (3 g/l).

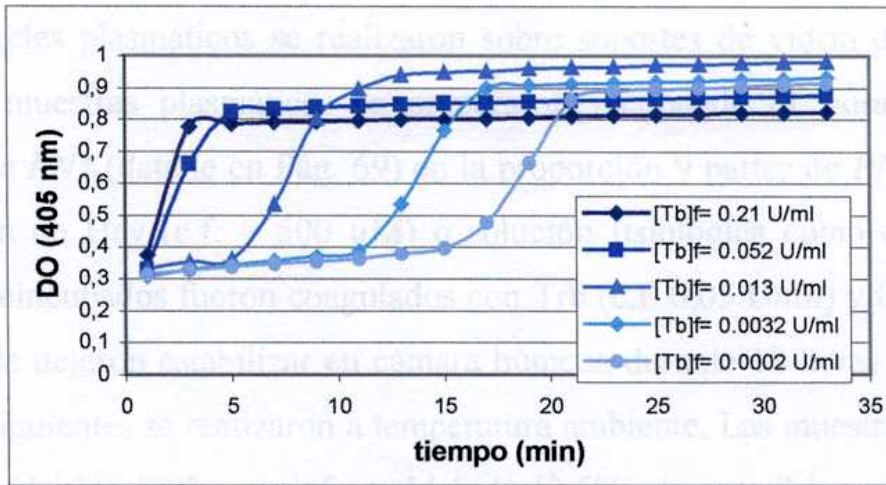
Cuando se graficó la DO a 405 nm en función del tiempo se obtuvieron las curvas correspondientes, que fueron caracterizadas mediante los siguientes parámetros: **la fase lag** de la curva sigmoidea corresponde al tiempo de inicio de la coagulación; la **pendiente** representa la velocidad de fibrinoformación y la **DO máxima** está asociada a la densidad de la estructura final de la fibrina.



**Figura 23:** Parámetros de curvas sigmoideas.

### Selección de condiciones experimentales

Fue necesario establecer condiciones de trabajo que permitieran detectar en una etapa posterior, las posibles variaciones causadas por efecto de la Hcy. Para ello se realizaron ensayos cinéticos a 37°C: Se agregó (a tiempo=0) una alícuota de *pool* de plasma normal, sobre CaCl<sub>2</sub> (c.f.= 33 mM) y Trb bovina en diferentes concentraciones y se registró la densidad óptica (DO) a 405 nm en función del tiempo. Los promedios de los valores están graficados en la Figura 24. Las concentraciones indicadas son las finales en el medio de reacción. Se han graficado las distintas curvas en el mismo gráfico para facilitar la comparación entre ellas; no se han indicado los desvíos estándar para simplificar la imagen. Los parámetros de las curvas resultantes están presentados en la Tabla 1.



**Figura 24:** Cinética de Fibrinoformación plasmática con diferentes concentraciones de Trb.

**Tabla 1:** Parámetros de las curvas correspondientes a la cinética de fibrinoformación realizadas con diferentes concentraciones de Trb.

[Trb] final (U/ml)	fase lag (min)	Pendiente (1/min)	DO máx
0,21	1 ± 0	0,211 ± 0,01	0,840 ± 0,04
0,052	1,5 ± 0	0,168 ± 0,02	0,884 ± 0,01
0,013	5,12 ± 0,41	0,115 ± 0,04	0,964 ± 0,03
0,0032	9,5 ± 2,06	0,156 ± 0,05	0,919 ± 0,02
0,0008	11,5 ± 1,97	0,123 ± 0,04	0,918 ± 0,02
0,0002	14,5 ± 1,94	0,139 ± 0,05	0,917 ± 0,03

La fase lag de la curva sigmoidea, es inversamente proporcional a la concentración de Trb, Esto indica que la velocidad de escisión de los extremos amino-terminal de las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$  del fibrinógeno y la consiguiente liberación de los fibrinopéptidos A y B aumenta con la concentración de Trb.

## **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Los geles plasmáticos se realizaron sobre soportes de vidrio de 7 mm de lado. Las muestras plasmáticas se prepararon incubando (1 hora, a 37 °C) alícuotas de *PN\** (detalle en Pág. 69) en la proporción 9 partes de *PN\** + 1 parte de solución de Hcy (c.f. = 500  $\mu$ M) o solución fisiológica como control. Los plasmas preincubados fueron coagulados con Trb (c.f. 0,05 U/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (c.f. = 33 mM). Se dejaron estabilizar en cámara húmeda durante 18 horas a 4 °C. Los pasos subsiguientes se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (30%)- paraformaldehído (2,5%) durante 2 horas; se lavaron con buffer cacodilato y fueron postfijadas con tetróxido de osmio (1%). Luego fueron deshidratadas con soluciones de acetona en agua en concentraciones crecientes (50, 70, 85 y 100 %). Las muestras se secaron por punto crítico (Baltec CPD 030, Balzers, Alemania) y fueron metalizadas para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss DMS 940 A, Oberkochen, Alemania) <sup>181</sup>. Las observaciones se realizaron a 5 kV y se obtuvieron las fotografías correspondientes a 3.000 aumentos.

Para realizar mediciones sobre las fotografías de las observaciones microscópicas se utilizó un analizador de imágenes Leica Cambridge Ltd. Q520 (Inglaterra) o el programa Imaje J. Se evaluaron al menos 10 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red midiendo: número de fibras por campo, % de red (relación porcentual entre la superficie ocupadas por las fibras respecto al área total del campo), ancho y largo de las fibras.



## TROMBOELASTOGRAMA

El tromboelastógrafo es el instrumento utilizado en el laboratorio de hemostasia para registrar el proceso de coagulación y fibrinólisis en su conjunto; muestra los cambios dinámicos en la rigidez de los coágulos, complementando la información que aportan las pruebas cinéticas.

Dentro de una visión global del proceso de coagulación, el tromboelastograma (TEG) permite evaluar la cinética de la formación de fibrina y las características del trombo formado. Sus variaciones están relacionadas con el número de plaquetas, el contenido y la calidad del Fbg. En condiciones normales la fibrinólisis comienza a detectarse aproximadamente a la hora de iniciado el estudio, resultando de gran utilidad cuando este proceso está acelerado.

Este sistema, descrito en 1948 por el Dr. Hartert de la Universidad de Heidelberg, Alemania, tomó impulso a partir de 1980 para monitoreos de la hemostasia intraquirúrgica. A pesar de la correlación no significativa entre los parámetros obtenidos por esta técnica y los resultados de los estudios globales de coagulación, aporta valiosa información en casos de coagulación intravascular diseminada (CID), trombocitopatías, presencia de inhibidores, hiperfibrinólisis y especialmente en cirugía cardiovascular y trasplante hepático.

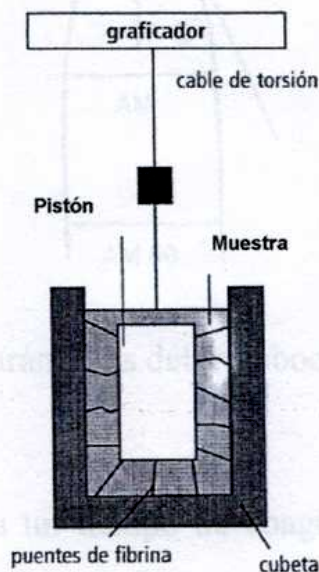
### *Fundamento del Sistema*

El tromboelastógrafo mide la respuesta del material a grandes deformaciones. Evalúa reológicamente al coágulo en condiciones de no linealidad. Este instrumento es un reómetro de cilindros coaxiales con sistema Couette, donde la cubeta oscila con una velocidad determinada y el material en estudio transmite al cilindro interior (pistón) un momento de giro proporcional a su velocidad.

La muestra se coloca en una cubeta cilíndrica. El pistón desciende mecánicamente dentro de la cubeta, de modo que entre ambos exista una

distancia uniforme de 1 mm, así, el pistón queda suspendido inmerso en la muestra contenida en la cubeta. El volumen libre entre la cubeta y el pistón es de 360  $\mu\text{l}$ . El cilindro y la cubeta son de acero pulido, no mojable (tipo V2A) cuya naturaleza impide la retracción del coágulo. La cubeta oscila en un movimiento vaivén de  $4^\circ 45'$  sobre una platina termostatzada a  $37^\circ\text{C}$ . Cada ciclo de oscilación dura 10 segundos incluyendo un período de reposo de 1 segundo al final de cada ciclo. El movimiento de la cubeta es transmitido al pistón únicamente a través de la muestra; a medida que transcurre el proceso de coagulación se va generando fibrina que conecta progresivamente ambas piezas, provocando que el pistón acompañe a la cubeta en su oscilación.

El pistón está conectado a un alambre de torsión. Una aguja conectada al alambre de torsión, oscila en cada ciclo acompañando el momento de rotación del pistón, y su oscilación queda registrada en papel termosensible que se desplaza a una velocidad de 2 mm/min<sup>183-185</sup>.



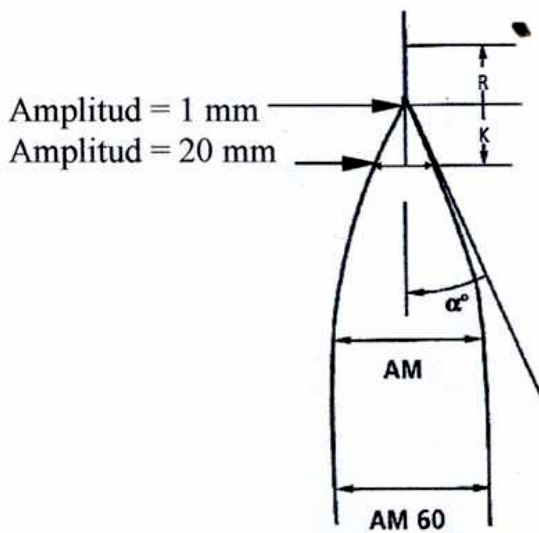
**Figura 25:** Esquema del tromboelastógrafo.

### **Parámetros del TEG y su interpretación**

Mientras la muestra se encuentra en estado líquido, no se detecta movimiento en el pistón. Por lo tanto la aguja no oscila y el avance del papel dibujará una línea vertical. Con la aparición de la fibrina el pistón comienza a

transmitir el movimiento de la cubeta y la aguja comienza a oscilar. El tiempo transcurrido desde el inicio del TEG hasta que la amplitud sea de 1 mm (aparición de trazas de fibrina) se denomina *tiempo de reacción* ( $r$ ): indica el comienzo de la transformación de protrombina en trombina. A medida que aumenta la cantidad de fibrina formada, el coágulo se va solidificando y la oscilación de la aguja aumentará hasta la amplitud máxima (Figura 26).

El tiempo desde el comienzo de la coagulación (donde termina  $r$ ) hasta que la amplitud alcanza 20 mm se denomina  $k$ , es el tiempo empleado en la formación de un coágulo de rigidez seleccionada, que será una medida inversamente proporcional a la velocidad de su formación<sup>186,187</sup>.



**Figura 26:** Parámetros del tromboelastograma.

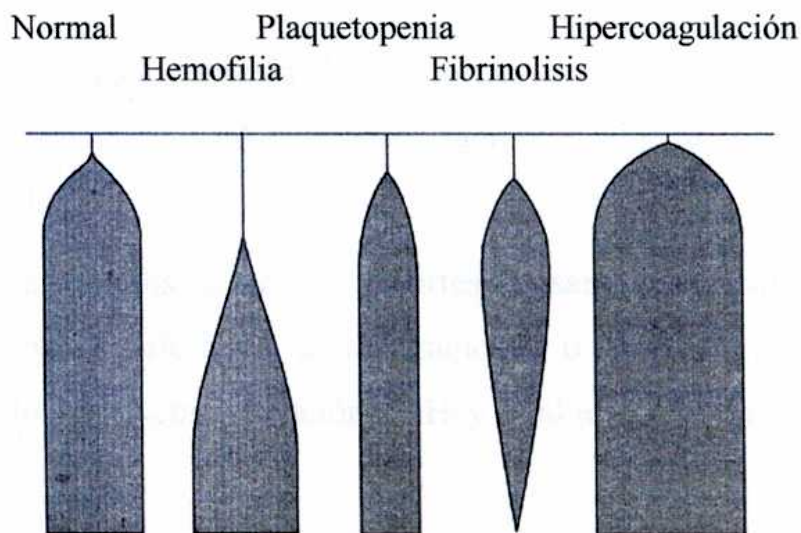
$r + k$  se aproxima a un tiempo de coagulación determinado por método cinético. La correlación no significativa encontrada entre los parámetros obtenidos del TEG y de métodos cinéticos se debe principalmente a las variaciones en el punto final.

El ángulo ( $\alpha$ ) se forma entre la línea central y el borde exterior durante la apertura del trazado.  $k$  y  $\alpha$  son parámetros que miden la velocidad de formación de la fibrina.

La amplitud máxima que alcanza el trazado (am) indica el grado de solidez del coágulo formado. Se desarrolló una escala relativa de solidez ( $\epsilon$ ) donde a un coágulo normal, cuyo trazado presenta una  $am = 50$  mm, se le asignó un valor arbitrario de  $\epsilon = 100$  que se obtiene a partir de:

$$\epsilon = \frac{100 \times am}{100 - am}$$

Los tromboelastogramas generados pueden adoptar formas diversas, que permiten interpretar sencillamente situaciones hemostáticas complejas.



**Fig 27:** Trazados de tromboelastogramas en diferentes situaciones fisiopatológicas.

### ***Muestras y Técnicas a Utilizar en TEG***

Se puede estudiar sangre nativa, plasma pobre o rico en plaquetas o cualquier medio coagulable que conduzca a la formación de fibrina. Combinando los materiales de estudio se complementan resultados que aportan valiosa información.

Con plasma pobre en plaquetas se reduce la interpretación a la funcionalidad del Fbg, deficiencias leves de factores de coagulación o a la presencia de inhibidores. Cantidades crecientes de plaquetas, Fbg o FXIII producirán trazados de TEG más amplios (mayor rigidez). Por el contrario, mayor cantidad de eritrocitos producen el efecto inverso.

Las técnicas utilizadas son muy diversas; puede usarse sangre nativa (sin anticoagulantes) recogida directamente en la cubeta, sangre citratada recalcificada, plasma pobre o rico en plaquetas coagulado con reactivo de TTAP con activador soluble o con Trb-  $\text{Ca}^{2+}$ , agregado de sustancias con actividad fibrinolítica (u-PA, t-PA), etc.

### ***TEG de Sangre Entera***

Se utilizó sangre citratada de individuos cuyos valores hematimétricos, recuento plaquetario, TP, TTAP y concentración de Fbg se encontraban dentro del rango normal.

Se incubaron 1 hs. a 37° C, 9 partes de sangre citratada + 1 parte de solución de Hcy de diferentes concentraciones o solución fisiológica como control, de modo que la concentración de Hcy final agregada fue 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ .

Se utilizó un tromboelastógrafo Thromboelastograph D (EEUU). Es fundamental la correcta limpieza de las cubetas y pistones para evitar trazados defectuosos (escalonado) que pueden llevar a resultados erróneos.

Para realizar el TEG, en la cubeta se coloca 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  1,29 mM, y 300  $\mu\text{l}$  de la sangre incubada. Inmediatamente se baja el pistón y se agrega una gota de vaselina líquida para evitar el secado de la muestra. Los TEG se prolongaron hasta alcanzar la amplitud máxima, ya sea porque la amplitud disminuyó o bien porque permaneció constante durante no menos de 10 minutos.

### TEG de Plasma Normal

Las muestras plasmáticas se prepararon incubando (1 hora, a 37 °C) alícuotas de PN\* (detalle en Pág. 69) en la proporción 9 partes de PN\* + 1 parte de solución de Hcy (c.f. = 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) o solución fisiológica como control. El plasma fue convenientemente alícuotado y congelado a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el momento de realizar el TEG.

En la cubeta del TEG se colocaron 325  $\mu\text{l}$  de la muestra preincubada y 25  $\mu\text{l}$  de una mezcla de Trb- $\text{Ca}^{2+}$ , ambas estabilizadas a 37 °C, de modo que las concentraciones finales fueron Trb: 0,05 UI/ml y  $\text{Ca}^{2+}$ : 33mM. Se continuaron los TEG como se describió para sangre entera.

#### Valores de referencia :

	Sangre recalcificada	Plasma rico en plaquetas (PRP)
$r$ (min)	$12 \pm 2$	$9 \pm 1,5$
$k$ (min)	$5 \pm 1$	$3 \pm 1$
$r + k$ (min)	$17 \pm 3$	$11,5 \pm 2,5$
$am$ (mm)	$55 \pm 6$	$58 \pm 5$
$\epsilon$	$120 \pm 30$	$140 \pm 25$

#### Fundamento del Sistema

Para definir el término deformación consideraremos un cuerpo que se encuentra entre dos placas paralelas, firmemente adherido a la superficie de ambas placas. Si aplicamos una fuerza tangencial que empuja la cara superior, considerando que el material se comporta como un sólido ideal, el mismo se deformará de modo semejante al desplazamiento individual de cartas en un mazo. El esfuerzo  $\tau$  (fuerza de cizallamiento o shear stress) es en realidad la fuerza aplicada sobre el área de contacto.

## REOMETRÍA

La reometría estudia la deformabilidad de los materiales; describe y cuantifica cómo se deforma un cuerpo por efecto de esfuerzos externos.

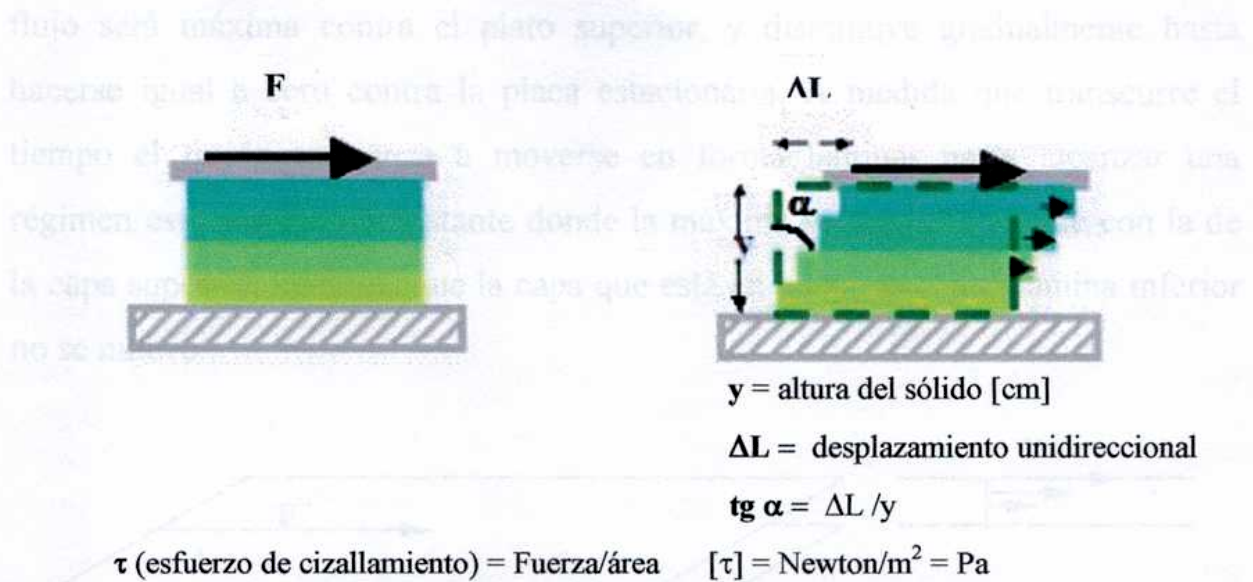
Si se aplica un esfuerzo a un sólido ideal éste se deforma elásticamente, es decir como un resorte. Cuando desaparece el esfuerzo, la energía de deformación se recupera totalmente, recobrando su forma original.

Si se aplica un esfuerzo a un líquido ideal éste se deforma permanentemente. La energía recibida se transforma en movimiento: “fluye”. Cuando desaparece el esfuerzo, la energía de deformación no puede ser recuperada, el fluido no es capaz de recobrar su posición original. Para mantener flujo en un fluido, debe agregarse energía continuamente. La resistencia de un fluido contra algún cambio de posición de su volumen se denomina viscosidad <sup>188</sup>.

La mayoría de los materiales (por ejemplo geles) no son ni sólidos ideales, ni líquidos ideales, son materiales viscoelásticos, o sea que se caracterizan por una componente sólida o elástica y otra líquida o viscosa, las cuales pueden ser medidas mediante un reómetro. El reómetro es un instrumento que registra la resistencia del material a la deformación producida por esfuerzos controlados y, mediante una serie de ecuaciones matemáticas complejas, informa parámetros estructurales característicos del material en estudio cuando el mismo es evaluado en condiciones de linealidad.

### *Fundamento del Sistema*

Para definir el término deformación consideremos un cuerpo que se encuentra entre dos placas paralelas, firmemente adherido a la superficie de ambas placas. Si aplicamos una fuerza tangencial que empuja la cara superior, considerando que el material se comporta como un **sólido ideal**, el mismo se deformará de modo semejante al desplazamiento individual de cartas en un mazo. El esfuerzo  $\tau$  (fuerza de cizallamiento o shear stress) es en realidad la fuerza aplicada sobre el área de contacto.



**Figura 28:** Esquema de desplazamiento unidireccional de un cuerpo

Los sólidos ideales sometidos a esfuerzos de cizallamiento ( $\tau$ ) reaccionan con una variación en el desplazamiento angular ( $\alpha$ ) cuya tangente es el cociente entre el desplazamiento unidireccional ( $\Delta L$ ) y la altura del sólido ( $y$ ).

Un sólido ideal se comporta como un resorte elástico que obedece a la Ley de Hooke. Si la fuerza que deforma un resorte deja de actuar, la deformación vuelve a cero y el cuerpo retoma su forma original.

Un sólido ideal está caracterizado por su módulo de Young ( $G$ ) que cumple con la relación:

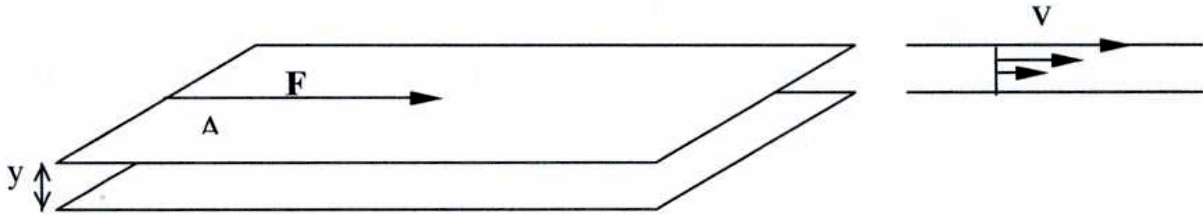
$$\tau = G \cdot dL/dy = G \cdot \gamma \quad [G] = \text{Pa}$$

En esta ecuación,  $G$  es un factor de correlación que indica la dureza del sólido, vinculado principalmente a la naturaleza estructural del material involucrado;  $G$  define la resistencia del sólido a la deformación.

Cuando se aplica una fuerza de cizallamiento a un **líquido ideal** entre dos platos paralelos suficientemente grandes, el líquido comienza a fluir con una velocidad proporcional a la resistencia interna que opone el líquido al movimiento, es decir a su viscosidad. Cuando el sistema está en reposo y en el tiempo = 0 la lámina superior comienza a moverse con velocidad constante  $v$ . La capa de fluido que está en contacto con la lámina superior la acompaña en su movimiento con la misma velocidad, no así las capas inferiores. La velocidad de



flujo será máxima contra el plato superior, y disminuye gradualmente hasta hacerse igual a cero contra la placa estacionaria. A medida que transcurre el tiempo el fluido comienza a moverse en forma laminar hasta alcanzar un régimen estacionario o constante donde la máxima velocidad coincide con la de la capa superior, mientras que la capa que está en contacto con la lámina inferior no se mueve.



**Figura 29:** Esquema de flujo laminar entre dos placas planas, la superior móvil y la inferior estacionaria.

Isaac Newton encontró la ley elemental de la viscosimetría, que describe el comportamiento de un líquido ideal:

$$\tau = \eta \cdot D$$

$\eta$  (viscosidad dinámica)

$$[\eta] = \text{Pa}\cdot\text{s}$$

$D$  (gradiente de velocidad)  $= \frac{dv}{dy}$

$$[D] = \frac{\text{cm/s}}{\text{cm}} \text{ s}^{-1}$$

Considerando la deformación mostrada en el esquema de flujo laminar, podemos reemplazar la derivada de la velocidad por  $dL/dt$ .

$$D = \frac{dv}{dy} = \frac{dL/dt}{dy} = \frac{dL/dy}{dt} = \frac{dy}{dt}$$

Esto quiere decir que, mientras, la fuerza de cizallamiento provoca una deformación de los sólidos, en los líquidos es importante la velocidad con que se produce la deformación. Ésta dependerá de la rapidez con que se crean las fuerzas que provocan el flujo. La viscosidad depende de 5 parámetros: temperatura, presión, tiempo en que se aplica la fuerza de cizallamiento,

D (gradiente de velocidad), pero principalmente de la constitución físico-química de la sustancia a medir.

Como se dijo anteriormente, los materiales reales no son ni sólidos ideales, ni líquidos ideales, son materiales viscoelásticos. Los parámetros  $G$  y  $\eta$  sirven para expresar cuantitativamente la componente sólida y la fluida que caracterizan al material viscoelástico en estudio. Una forma de estudiar los sistemas materiales y poder conocer los valores de  $G$  y  $\eta$  es por medio de ensayos dinámicos que se realizan con un reómetro rotacional de esfuerzo controlado, en el cual la muestra es colocada entre dos platos paralelos, uno estacionario (donde se apoya la muestra) y otro rotatorio, que gira apoyado sobre la muestra. Cuando gira el plato en un movimiento oscilatorio, se crea un flujo laminar en la muestra que se asemeja a la torsión de una columna de monedas, causando que cada moneda se desplace un pequeño ángulo con respecto a la moneda adyacente. El ángulo de giro es muy pequeño, inferior a un grado.

Si se aplica a la muestra una deformación conocida ( $\gamma_0$ ), el material responde con un esfuerzo  $\tau$  que puede representarse como:

$$\tau = G' \gamma_0 \sin \omega t + G'' \gamma_0 \cos \omega t$$

La velocidad angular  $\omega$  está relacionada con la frecuencia de oscilación según:

$$\omega = 2 \pi f \quad [\omega] = s^{-1} \quad f = \text{frecuencia} \quad [f] = \text{Hz}$$

El término  $G'$ , denominado módulo sólido o de almacenamiento, indica que el esfuerzo es temporariamente almacenado por el material durante el ensayo. El módulo fluido o viscoso ( $G''$ ), también llamado módulo de pérdida, representa a la energía recibida por el material que ha sido utilizada para iniciar el flujo y es perdida irreversiblemente como calor. La relación  $G''/G'$  es llamada  $\tan \delta$ , donde  $\delta$  es el ángulo de desfase producido entre la onda sinusoidal del estímulo y la onda de respuesta del material.



**Figura 30:** Esquema del flujo laminar en un reómetro rotacional.

### **Ensayos de Reometría Dinámica**

**Muestra :** Se incubaron (1 h a 37 °C) alícuotas de *PN\** (Pág. 69), en la proporción 9 partes de plasma más 1 parte de solución de Hcy (en solución fisiológica), de modo que la concentración final del aminoácido en el plasma resultó 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . El control se realizó con igual volumen de solución fisiológica. El plasma preincubado fue alicuotado y congelado a  $-70$  °C.

**Procedimiento experimental:** Los geles se prepararon en soportes de acrílicos de 35 mm de diámetro, apoyados sobre un plano nivelado para que el espesor del gel resulte uniforme. En cada placa se colocaron volúmenes adecuados de Trb –  $\text{Ca}^{2+}$  y de la mezcla plasmática preincubada de modo que las concentraciones finales fueron:  $[\text{Trb}] = 0,05$  U/ml y  $[\text{Ca}^{2+}] = 33$  mM la mezcla se homogeneizó y distribuyó con una varilla de vidrio de modo de cubrir totalmente la superficie y se lo dejó gelificar en cámara húmeda sobre una superficie nivelada (2 horas a 37 °C).

El uso de los soportes permite la nivelación, estabilización y transporte de los geles, manteniendo las mismas condiciones utilizadas en otros ensayos y así asegurar la formación de fibrina de la misma estructura. El inconveniente es que los valores de las constantes reométricas calculadas por el instrumento no corresponden a las características absolutas de cada muestra, aunque resultaron útiles para comparar los distintos geles.

Las mediciones se realizaron dentro de las 4 horas posteriores a la preparación de los geles, en un reómetro rotacional de esfuerzo controlado (Paar Physica, MCR 300, Stuttgart, Alemania).

Para su medición, cada muestra fue colocada sobre la platina del reómetro termostaticada a 37 °C mediante un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar

Physica). Se utilizó la geometría de platos paralelos (superficie rugosa) de 30mm de diámetro. Para evitar la deshidratación del gel durante la medición, se colocó un pequeño contenedor con agua destilada, aislando la celda de medición con un aro de acrílico con tapa. Antes de cada experiencia se dejó la muestra 2 minutos para alcanzar el equilibrio térmico y mecánico.

Con el objeto de conocer el comportamiento mecánico de estos geles se realizaron en primer lugar, una serie de determinaciones exploratorias, variando el esfuerzo aplicado, la frecuencia y superficies de distinta rugosidad. Para establecer las condiciones a utilizar en los barridos de frecuencia, se determinaron los rangos de viscoelasticidad lineal, para cada concentración de Hcy, mediante un barrido de esfuerzo tangencial de 0 a 4 Pa, a frecuencias constantes de 0,01; 0,1 y 1 Hz. A partir de estos ensayos, se seleccionó una deformación de 0,07% para realizar los ensayos de barrido de frecuencia en condiciones de linealidad (relación esfuerzo/deformación = constante), lo que permite determinar los parámetros característicos del material.

Inicialmente se realizaron barridos de frecuencia a deformación constante; elegida dentro del rango de viscoelasticidad lineal de las muestras. Para estos ensayos se utilizó un rango de frecuencias entre 0,01 y 3 Hz y una deformación de 0,07%. Los parámetros determinados mediante los barridos de frecuencia fueron: el módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ) y la  $\text{tg } \delta$ . Se informan los promedios y desvíos estándar de los replicados ( $n = 6$ ) obtenidos de 2 lotes diferentes de geles para cada concentración de Hcy ensayada.

A continuación se realizaron barridos de frecuencia a esfuerzo constante, siempre en condiciones de linealidad (sin romper la estructura) permitiendo, además, que el tiempo sea suficiente entre cada medición para que la estructura libere la energía acumulada durante cada medición a lo largo del ensayo.

Con el fin de determinar el límite de comportamiento viscoelástico lineal de las distintas muestras a deformación creciente, también se realizaron, además, barridos de deformación a frecuencia constante (0,1 Hz, por triplicado).

## COMPACTACIÓN

La compactación es una característica que indica cuánto se colapsa un material por efecto de fuerzas externas. En el caso de geles de fibrina depende de la rigidez de la estructura de la red y del tamaño del compartimento limitado por esa estructura.

Los ensayos de compactación se utilizan para evaluar la respuesta a la fuerza centrífuga, de los geles de fibrina obtenidos a partir de plasma o fibrinógeno de pacientes con disfibrinogenemias.

Se utiliza fuerza centrífuga cuya magnitud está determinada por la velocidad y el tiempo de centrifugación.

### *Compactación de Fibrina Plasmática*

Para realizar el ensayo de compactación se incubaron (1 hs, 37°C) alícuotas de *PN\** (detalle en Pág. 69), con una solución recién preparada de Hcy en la proporción 9 partes de plasma + 1 parte de diluciones de Hcy (c.f. = 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ). Se utilizó SF como control. Luego de la incubación ambas mezclas se diluyeron al medio con *buffer* Tris-NaCl y se prepararon geles de fibrina por triplicado en microtubos plásticos, con 650  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas anteriores y 50  $\mu\text{l}$  de Trb- $\text{Ca}^{2+}$  (c.f. Trb = 0,05 U/ml; c.f. Ca = 33 mM). Se deja gelificar a 37 °C durante 2 hs; luego los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos, y se determina el peso de la solución exudada en balanza analítica (Mettler H10T, d = 0,1 mg, Küsnacht, Suiza) <sup>123</sup>.

Los resultados se expresan en porcentaje de compactación, calculado como la relación porcentual entre el volumen exudado y el volumen original del gel de fibrina.

### *Compactación de Fibrina Obtenida a partir de Sustancias Purificadas.*

Para realizar el ensayo de compactación con sustancias purificadas se incubaron (1 hs, 37°C) alícuotas de una solución conteniendo fibrinógeno

purificado (c.f. = 3 g/l), con una solución recién preparada de Hcy (c.f. = 5 mM) en la proporción 9 partes de Fbg + 1 parte de Hcy. Se utilizó SF como control. Luego de la incubación ambas muestras se diluyen al medio con *buffer* Tris-NaCl y se preparan geles de fibrina por triplicado en microtubos plásticos, con 650  $\mu$ l de cada una de las diluciones anteriores y 50  $\mu$ l de Trb-Ca<sup>2+</sup> (c.f. Trb = 0,1 U/ml; c.f. Ca<sup>2+</sup> = 33 mM). Se permite la gelificación a 37 °C durante 2 h; luego se centrifugan los tubos en una microcentrífuga a 2000 rpm durante 2 minutos, y se determina el peso de la solución exudada en balanza analítica. Los resultados se expresan en porcentaje de compactación, como se describió para geles de fibrina plasmática.

$$Q = \frac{V}{t} = \frac{K_s \cdot A \cdot g \cdot \Delta h}{\eta \cdot L}$$

Q = Caudal o flujo

V = Volumen

t = tiempo

K<sub>s</sub> = Coeficiente de permeabilidad intrínseca del sólido

$\eta$  = viscosidad dinámica del fluido

A = área o sección de la columna de sólido

L = largo de la columna de sólido

g = aceleración de la gravedad

$\Delta h$  = diferencia de altura del fluido

Por lo tanto, si se determina el caudal para diferentes alturas, se puede calcular K<sub>s</sub> del material compactado en la columna, también conocida como constante de Darcy.

## PERMEABILIDAD

El flujo de un líquido a través de un sólido es un fenómeno complejo que depende de la naturaleza del sólido, del tipo de fluido y de la geometría del sistema de medición. Si se coloca una columna (de sección A y largo L) conteniendo el material en estudio y se mide el flujo de líquido a través de él, se comprueba que el caudal (volumen de líquido que fluye por unidad de tiempo) es directamente proporcional a la diferencia de presión ejercida por el líquido. Esta última, a su vez, se calcula como la diferencia de altura entre el nivel superior de fluido y el material sólido, por la aceleración de la gravedad. Además, el flujo depende en forma directa del coeficiente de permeabilidad intrínseca del sólido ( $K_s$ ), e inversamente a la viscosidad del fluido. En cuanto a la geometría de la columna, el caudal es directamente proporcional al área e inversamente proporcional a su longitud.

$$Q = \frac{V}{t} = \frac{K_s \cdot A \cdot g \cdot \Delta h}{\eta \cdot L}$$

Q = Caudal o flujo

V = Volumen

t = tiempo

$K_s$  = Coeficiente de permeabilidad intrínseca del sólido

$\eta$  = viscosidad dinámica del fluido

A = área o sección de la columna de sólido

L = largo de la columna de sólido

g = aceleración de la gravedad

$\Delta h$  = diferencia de altura del fluido

Por lo tanto, si se determina el caudal para diferentes alturas, se puede calcular  $K_s$  del material contenido en la columna, también conocida como constante de Darcy.

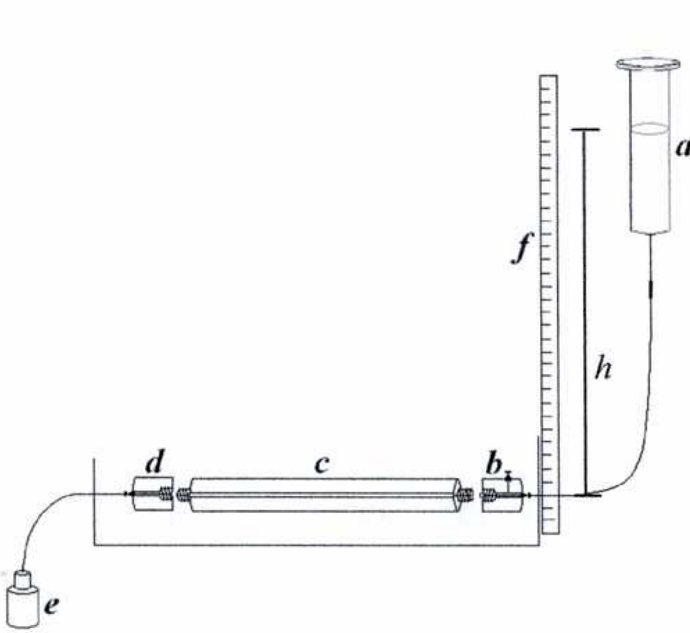
Esta ecuación es utilizada para determinar la permeabilidad de geles de fibrina obtenidos a partir de distintas concentraciones de fibrinógeno, trombina<sup>114,116,118,189</sup> y estudiar disfibrinogenemias<sup>124,189</sup>, por lo que se adoptó para evaluar el comportamiento de los geles de fibrina en presencia de Hcy.

### ***Descripción del Sistema Utilizado***

Un dispositivo cilíndrico sirve de molde para que los geles de fibrina se formen con dimensiones definidas. La columna conteniendo la fibrina se conecta con un reservorio de fluido a través de tubuladuras flexibles de pequeña sección, que permiten variar la altura del reservorio y por lo tanto la presión ejercida sobre el gel (Figura 31). El terminal adaptador de entrada conecta la columna con el reservorio de fluido; contiene un orificio de purgado para eliminar las burbujas atrapadas a la entrada de la fibrina. El terminal adaptador de salida permite recoger el fluido, mientras que contiene a la fibrina evitando que se deforme o desprende del soporte acrílico. Ambos adaptadores tienen extremos tallados que se enroscan a la columna; se utiliza cinta de teflón impermeable para evitar pérdidas entre las uniones. En la figura 31 se han colocado las piezas separadas y se han omitido los soportes para simplificar los esquemas.

La preparación de las muestras se detalla más adelante. Una vez gelificada la fibrina, la columna se conecta al sistema colocando primero el conector de salida, luego el de entrada con la tubuladura desconectada, para que la presión ejercida al enroscar el acrílico no rompa ni desprende el gel de fibrina y al mismo tiempo desaloje el aire totalmente. Las burbujas de aire actúan impidiendo el pasaje de fluido, por lo tanto debe evitarse que quede aire atrapado, por lo que es necesario desairear la solución eluyente para que no se acumulen burbujas en el sistema. Para finalizar, se conecta la tubuladura de entrada, manteniendo el nivel del fluido del reservorio a baja altura.





**Figura 31:** Sistema para medir permeabilidad

- a. Reservorio de fluido
- b. Adaptador de Entrada
- c. Columna
- d. Adaptador de salida
- e. Frasco tarado
- f. Regla
- h. diferencia de altura



**Figura 32:**

- Preparación de la columna
- a. Jeringa para aspiración
  - b. Conector de goma
  - c. Columna de acrílico
  - d. Contenedor de la mezcla

El fluido utilizado fue SF. La diferencia de altura se mide entre el centro de la columna del gel de fibrina y el nivel superior de líquido del contenedor. El reservorio se coloca a 20 cm de altura y se sube gradualmente hasta que el fluido comienza a drenar. Luego de comprobar que el sistema no tiene pérdidas se sumerge en un baño termostatzado a 37° C.

Se mide el flujo a baja presión y se aumenta gradualmente, ya que, a altas presiones la fibrina puede alterarse irreversiblemente. Luego de seleccionar cada altura, se espera 5 minutos para que el sistema alcance el equilibrio. El caudal se determina recogiendo (en frascos tarados) el fluido que sale del sistema durante un período de tiempo exactamente medido. El volumen se mide por gravimetría con balanza de precisión (+/- 0.0001 g).

Se realizaron mediciones por triplicado, al menos a 4 alturas diferentes en la zona de linealidad entre ambos parámetros, donde la pendiente de la recta para el mismo fluido depende únicamente de la permeabilidad del material.

### **Preparación de Geles de Fibrina Plasmática**

Es necesario emplear material completamente limpio, desengrasado, y a la vez libre de detergente, lavandina o contaminación, ya que modifica la adherencia de la fibrina al acrílico, además de su estructura.

Se incubó (1 hs. a 37°C) 9 partes de plasma + 1 parte de solución de Hcy recién preparada en diluciones adecuadas (o solución fisiológica como control) de modo que la concentración final de Hcy fuera 0; 50; 100; 250 y 500  $\mu\text{M}$ . El plasma incubado se alicuotó y congeló a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Una mezcla de Trb +  $\text{CaCl}_2$  en *buffer* Tris-NaCl fue alicuotada y congelada a  $-70^\circ\text{C}$  para ser usada en la preparación de cada muestra sin que varíe la concentración ni actividad de Trb en los distintos ensayos.

Para la preparación de cada gel, se colocaron volúmenes convenientes de Trb- $\text{Ca}^{2+}$  y plasma incubado, en un recipiente (Figura 32), de modo que la concentración final de Trb fue 0,05 U/ml y la de  $\text{Ca}^{2+}$  33 mM.

La mezcla se homogeneizó y se introdujo dentro de la columna por aspiración con una jeringa adaptada mediante una conexión de goma látex. Se dejó en reposo 1 hs. para asegurar la gelificación completa.

### **Preparación de Fibrina a Partir de Componentes Purificados**

Para realizar el estudio de permeabilidad con sustancias purificadas se utilizó Fbg humano (c.f. = 3 g/l) y concentrado de FXIII (c.f. = 0,5 U/ml). La mezcla de ambos componentes y cada uno separadamente, fueron incubados con Hcy y posteriormente tratados para eliminar el aminoácido libre del medio de reacción. Luego se prepararon las columnas con los geles de fibrinas correspondientes. Seguidamente se detallan cada uno de los sistemas:

La mezcla de Trb-Ca<sup>2+</sup> fue preparada, alicuotada y congelada hasta el momento de usarse en la proporción conveniente respecto a las soluciones de Fbg y FXIII, de modo que las concentraciones finales en el gel resultaron: Fbg: c.f. = 3 g/l; FXIII: c.f. = 0,5 U/ml; Trb: c.f. = 0,1 U/ml; CaCl<sub>2</sub>: c.f. = 33 mM.

Se incubaron (1 hora a 37°C) las siguientes muestras:

A) (Fbg + FXIII) + Hcy (9 partes de la solución proteica + 1 parte de la solución del aminoácido).

A') Control: (Fbg + FXIII) + SF (9 partes de la solución proteica + 1 parte SF). Se incubó (1 hora a 37°C)

B) Fbg + Hcy en la proporción (9 + 1).

B') Control: Fbg + SF (9 + 1).

Con el objeto de remover la Hcy, el sistema B (B y B') fueron dializados a través de membranas Spectrapor de cut off 12.000-14.000, 4 horas a 4°C con agitación permanente y renovando la SF para acelerar el proceso; luego se dejó dializar a 4 °C toda la noche. Cantidades adecuadas de la solución de Fbg fueron alicuotada y congeladas a -70 °C hasta su uso.

C) FXIII (62 U/ml) + Hcy (c.f. = 5 mM), en la proporción (1 + 1).

C') Control: FXIII (62 U/ml) + SF, en la proporción (1 + 1).

Con el objeto de remover la Hcy, el sistema C (C y C') fueron centrifugados a 1.000 rpm, en tubos Centicon-100 (de cut off 100.000), agregando SF (al menos 3 volúmenes iniciales). La solución de FXIII se recuperó en la concentración inicial, ajustando el volumen gravimétricamente en balanza de precisión; luego fue alicuotada y congelada a -70 °C hasta su uso.

Se prepararon los geles de fibrina correspondientes, por agregado de  $\text{Trb-Ca}^{2+}$  con:

- las muestras A) y A').
- las muestras B) y B'), cada una con el agregado de FXIII sin incubar (c.f. = 0,5 U/ml).
- las muestras C) y C'), cada una con el agregado de Fbg sin incubar (c.f.= 3 g/l).

Los detalles metodológicos para preparar estos geles fueron los mismos que los descritos precedentemente para obtener los geles de fibrina plasmática.

### **Consideraciones metodológicas**

Debió asegurarse que el fluido (SF) pase a través del material, sin deformarlo ni despegarlo de las paredes de la columna, evitando que se produzcan canales o grietas en los geles, porque se mediría un flujo independiente de la estructura del material.

El gel de fibrina requiere un tratamiento dedicado ya que, si bien es lo suficientemente firme como para soportar presiones elevadas, puede agrietarse repentinamente, anulando la experiencia.

La columna tallada en acrílico debe tener el largo necesario para detectar pequeñas variaciones de permeabilidad, con el inconveniente de requerir gran cantidad de muestra.

Un factor fundamental fue seleccionar y medir la presión ejercida. Inicialmente se utilizó una bomba de pistón de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y una columna capilar para medir la presión, pero, a bajas presiones la fibrina no es rígida, sino elástica, y produce fluctuaciones ante los movimientos del pistón. Por lo tanto, se utilizó un reservorio para el fluido, de altura variable para que la presión fuera ejercida de forma constante y seleccionada con facilidad. Ante una presión muy baja, el material resulta impermeable; aumentando gradualmente la altura (presión), el fluido drena a

través del gel, venciendo una resistencia similar a la fuerza de rozamiento. A altas presiones pueden producirse daños irreversibles en el material y debe darse por terminado el ensayo.

### Evaluación de los resultados

A partir del caudal y la altura del fluido, se calculó Ks para cada gel de fibrina ( $n \geq 12$ ) y se determinó su promedio y desvío estándar. Además se graficó el flujo en función de la altura, donde se puede observar la pendiente y desvíos de las mediciones.

En esta sección se evalúa la cinética de la actividad amolítica de plasmina, por una parte de y además, su actividad lítica sobre la fibrina.

### ENSAYOS AMOLÍTICOS

#### Determinación de Actividad de Plasmina

Se ensaya el efecto de distintas concentraciones de Hcy sobre la actividad amolítica de la plasmina utilizando un método cinético.



Todos los reactivos fueron estabilizados previamente a 37° C antes de comenzar el ensayo. En placas de poliestireno se colocaron, por triplicado, distintas concentraciones de Hcy (62,5, 125, 250, 500 y 1000 μM) y SF como control. El medio de reacción fue regado por *buffer* Tris 50 mM pH 7,5. En todos los pocillos se agregaron Plm (c.f. = 0,15 μM) y a tiempo 0 el sustrato cromogénico específico S-251 (c.f. = 0,5 nM). Se determinó la liberación de

## SISTEMA PLASMINÓGENO-PLASMINA

El proceso fibrinolítico involucra principalmente la activación del plasminógeno, la actividad de plasmina, y a la fibrina como sustrato. Existe una gran cantidad de proteínas plasmáticas moduladoras de cada una de las etapas de este proceso.

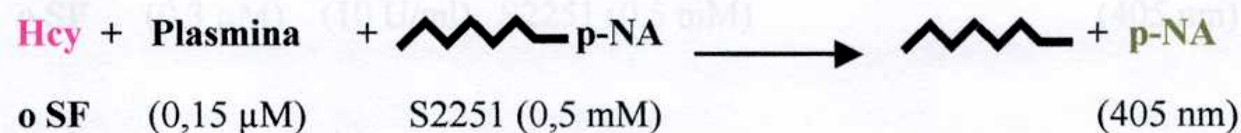
El efecto de la Hcy puede ser evaluado sobre la actividad fibrinolítica o aisladamente sobre la actividad biológica de los principales componentes involucrados en este sistema. Además, como la fibrina es el sustrato de la reacción lítica, su arquitectura y las dimensiones de sus fibras tienen decisiva ingerencia en la velocidad de su disgregación. Por lo tanto podemos considerar a la lisabilidad como otra propiedad de la fibrina.

En esta sección se evalúa la cinética de la actividad amidolítica de plasmina, por una parte de y además, su actividad lítica sobre la fibrina.

### ENSAYOS AMIDOLÍTICOS

#### Determinación de Actividad de Plasmina

Se ensayó el efecto de distintas concentraciones de Hcy sobre la actividad amidolítica de la plasmina utilizando un método cinético.



Todos los reactivos fueron estabilizados previamente a 37° C antes de comenzar el ensayo. En placas de poliestireno se colocaron, por triplicado, distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM) y SF como control. El medio de reacción fue regulado por *buffer* Tris 50 mM pH 7,5. En todos los pocillos se agregaron: Plm (c.f. = 0,15 μM) y a tiempo = 0, sustrato cromogénico específico S-2251 (c.f. = 0,5 mM). Se determinó la liberación de

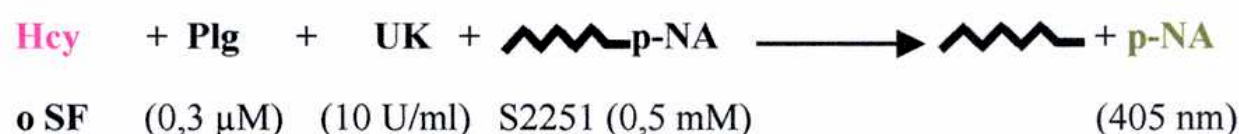
para-Nitroanilina (p-NA), midiendo la DO (a 405 nm) en función del tiempo hasta valor constante, en un lector de ELISA (Reader 100, Organon Teknica, EE.UU.). Cada ensayo fue realizado, por triplicado cada vez.

### Análisis de los resultados

Las curvas exponenciales obtenidas fueron analizadas estadísticamente con el programa Sigma-Plot. Se calculan las velocidades iniciales en presencia ( $V_{O_{Hcy}}$ ) y ausencia de Hcy ( $V_{O_{control}}$ ). Se define como factor de potenciación ( $FP_{Pm}$ ) al cociente entre  $V_{O_{Hcy}}$  y  $V_{O_{control}}$  y éste parámetro se utiliza para comparar los efectos del agregado de Hcy. Se considera un efecto potenciador cuando  $FP_{1/b} > 1$  y  $FP_{X_0} < 1$  y un efecto inhibitorio cuando  $FP_{1/b} < 1$  y  $FP_{X_0} > 1$ .

### Estudio de la Activación de Plasminógeno

Para evaluar la etapa de activación del plasminógeno (Plg) a plasmina (Plm) se utilizó un método amidolítico-cinético, empleando uroquinasa como activador de Plg y midiendo espectrofotométricamente la actividad amidolítica de la plasmina formada sobre el sustrato cromogénico específico.



En placas de poliestireno se colocaron, por triplicado, distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) y SF como control. El medio de reacción fue regulado por *buffer* Tris 50 mM pH 7,5. A todos los pocillos se agregaron: Plg (c.f. = 0,3  $\mu\text{M}$ ) y sustrato cromogénico S-2251 (c.f. = 0,5 mM). A tiempo = 0, se agrega UK (c.f. = 10 U/ml) y se monitorea la liberación de (p-NA) a 405 nm en un lector de ELISA (Reader 100, Organon Teknica, EE.UU.) en función del tiempo hasta valor constante.

La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de la Plm formada, de modo que en el gráfico de absorbancia vs. tiempo (min) se puede evaluar la cinética de activación de Plg y simultáneamente, la actividad de plasmina. Todos los reactivos fueron estabilizados a 37° C antes de comenzar el ensayo. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

### Análisis de los resultados

Las curvas sigmoideas obtenidas fueron caracterizadas mediante  $X_0$  (tiempo asociado al 50% de reacción) y  $1/b$  (estimador de la pendiente de reacción).

Se utilizó el programa estadístico Sigma-Plot y se ajustaron las curvas Y (Abs. 405 nm) vs. X (tiempo) con la siguiente ecuación:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + e^{-(X - X_0)/b}}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} Y_0 = \text{mínimo de Abs. (blanco)} \\ a = \text{Abs. máxima} - \text{Abs. mínima} \\ X_0 = \text{Tiempo asociado al 50\% de reacción} \\ 1/b = \text{estimador de la pendiente de reacción} \end{array} \right.$$

Para comparar los efectos del agregado de Hcy en las distintas concentraciones, se define factor de potenciación de  $X_0$  ( $FP_{X_0}$ ) al cociente entre  $X_{0\text{Hcy}}$  sobre  $X_{0\text{control}}$  y factor de potenciación ( $FP_{1/b}$ ) al cociente entre  $1/b_{\text{Hcy}}$  y  $1/b_{\text{control}}$ . Se considera un efecto potenciador cuando  $FP_{1/b} > 1$  y  $FP_{X_0} < 1$  y un efecto inhibitorio cuando  $FP_{1/b} < 1$  y  $FP_{X_0} > 1$ .



## **EVALUACIÓN DE LA FIBRINOLISIS**

Para evaluar la lisis se utilizaron dos sistemas diferentes: uno de ellos se realizó en una sola etapa, donde la Hcy estuvo presente durante la formación y lisis de la fibrina en su conjunto. El otro sistema, se realizó en dos etapas, separando ambos procesos, de manera que permitió evaluar el efecto del aminoácido en situaciones diferentes, como se describe más adelante.

## **EVALUACIÓN DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS EN UNA ETAPA**

En este sistema los activadores del plasminógeno se agregaron antes de formarse la fibrina. De modo que ambos procesos, coagulación y fibrinólisis, comenzaron simultáneamente (aunque con distinta velocidad) y luego fueron evaluados en forma conjunta.

Las condiciones de lisabilidad dependen de la estructura de la red y de las características del sistema lítico. La estructura de la fibrina depende principalmente de las concentraciones de fibrinógeno, trombina, otras proteínas y sales, mientras que el comportamiento del sistema lítico depende principalmente de las concentraciones de plasminógeno y activador del plasminógeno utilizado (u-PA o t-PA).

Fisiológicamente la lisis es un proceso mucho más lento que el de fibrinoformación; se requiere un sistema experimental que permita la formación de fibrina antes de comenzar su degradación y además que la lisis se desarrollara en un tiempo medible. Por lo tanto, debe establecerse un equilibrio entre las concentraciones finales de plasma, trombina, plasminógeno y uroquinasa. Además de ser fuente de fibrinógeno y plasminógeno, el plasma contiene muchas otras proteínas que regulan la fibrinoformación y lisis, principalmente los inhibidores de trombina y plasmina. Por lo tanto el efecto de diluir el plasma no implica solamente diluir el fibrinógeno sino también modificar la actividad de trombina y plasmina. Esto puede dificultar el entendimiento de los resultados.

Por eso se estandarizó el sistema de ensayo con sustancias puras en una primera etapa y luego con plasma.

### **Formación y Lisis de Fibrina a partir de Sustancias Puras.**

Se utilizaron soluciones de fibrinógeno y plasminógeno de modo de limitar el sistema exclusivamente a las sustancias que intervienen en las reacciones principales en mayor proporción. Se han variado las concentraciones de cada uno de los reactivos para evaluar como influyen éstos en la formación, estructura y lisis de la fibrina. Los diversos reactivos utilizados se combinaron en dos grupos, dejando separados las **enzimas** de sus **sustratos**, de modo que los distintos activadores se pusieron en contacto con sus efectores al mismo tiempo (tiempo = 0). En todos los casos el grupo que requirió menor volumen se colocó en la policubeta, y el grupo de los reactivos de mayor volumen, se colocó posteriormente (a tiempo = 0) para facilitar que la mezcla resulte homogénea. Con el objeto de comparar los resultados de los distintos ensayos en forma independiente del camino óptico, se acotó el volumen final en cada pocillo de la policubeta, a 120  $\mu$ l.

Este grupo de ensayos se realiza en base al siguiente esquema experimental: En una policubeta de poliestireno de fondo plano se colocaron 20  $\mu$ l de una mezcla de trombina, cloruro de calcio, uroquinasa, en buffer Tris - HCl en las concentraciones convenientes para alcanzar las concentraciones finales deseadas en cada ensayo particular.

Se colocaron las policubetas en un lector de ELISA y a tiempo = 0 se agregaron 100  $\mu$ l de una solución conteniendo fibrinógeno y plasminógeno, evitando la formación de burbujas. Se registró la densidad óptica a 405 nm a intervalos regulares de tiempo<sup>190</sup>.

Se realizaron controles de la etapa de coagulación del sistema empleado, reemplazando la uroquinasa por igual volumen de buffer. De este modo el plasminógeno no es activado a plasmina y se puede comprobar que la fibrinoforrnación resultó completa, descartando que comience la lisis antes de

concluir la formación de la fibrina.

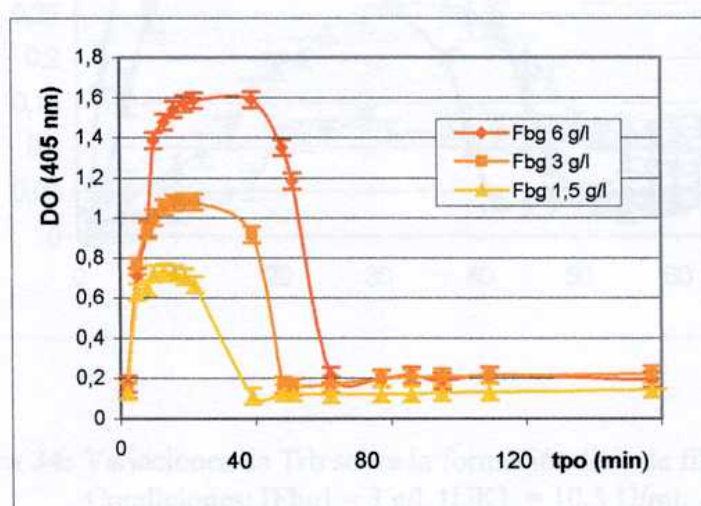
De las curvas obtenidas se determinaron los **tiempos de lisis final** - correspondientes al período de tiempo desde el inicio de la fibrinoformación, ( $t = 0$ ) hasta que se estabiliza la DO del producto de lisis- y/o los **tiempos de lisis 50%** - tiempo (desde  $t = 0$ ) que demoró en alcanzar el valor de DO correspondiente a la mitad del descenso total de DO.

### Selección de las condiciones experimentales.

Se variaron las concentraciones de los componentes utilizados para medir la velocidad de lisis de redes de fibrina formadas a partir de soluciones de fibrinógeno. Todas las curvas se realizaron por triplicado. Las concentraciones evaluadas figuran en la tabla 2.

**Tabla 2:** Concentraciones ensayadas de los componentes utilizados en sistema puro.

[Trombina] (U/ml)	0,01 - 0,05 - 0,24 - 0,84
[Fibrinógeno] (g/l)	1,5 - 3 - 6
[Plasminógeno] ( $\mu$ M)	0,3 - 0,6 - 1,2
[Uroquinasa] (U/ml)	1 - 5,5 - 10,5
[CaCl <sub>2</sub> ] (mM)	33

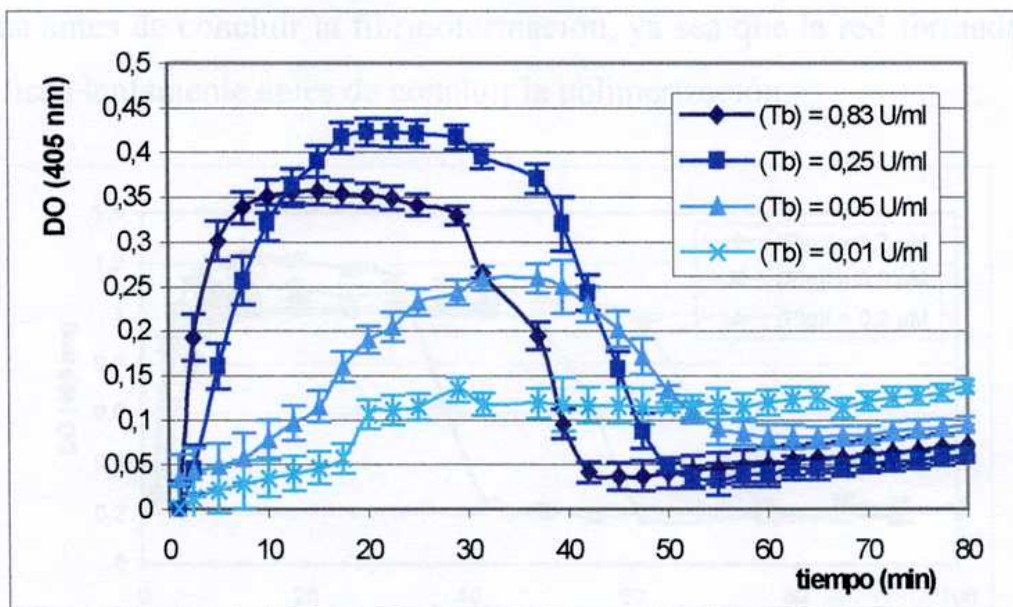


**Figura 33:** Variaciones de la concentración de Fbg sobre la formación-lisis de fibrina. Condiciones: [Trb] = 0,25 U/ml, [UK] = 10,5 U/ml.

**Tabla 3:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de Fbg. Condiciones correspondientes a la Figura 33.

[Fbg] (g/l)	t lisis (min)
6	63 ± 4
3	45 ± 3
1,5	38 ± 2

El efecto del fibrinógeno es muy claro: a mayor concentración de fibrinógeno, mayor DO final y mayor tiempo de lisis. Puede observarse que la lisis comienza tempranamente, ya que todos los pocillos contienen la misma cantidad de Plg y UK, pero la lisis se detecta antes en redes con menos Fbg (más abiertas). Por lo tanto con concentraciones de Fbg 3 y 6 g/l la lisis debe haber comenzado antes de completarse la formación de la fibrina, es decir que la DO de la curva es la resultante entre la formación y degradación de las fibras. Estos resultados se repitieron con las distintas concertaciones de trombina ensayadas.

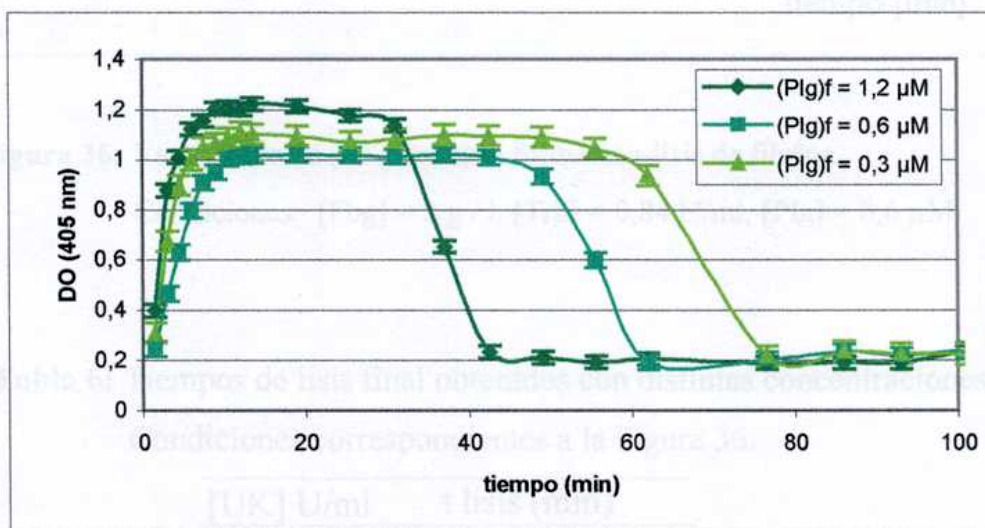


**Figura 34:** Variaciones de Trb sobre la formación-lisis de fibrina. Condiciones: [Fbg] = 3 g/l, [UK] = 10,5 U/ml.

**Tabla 4:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de Trb. Condiciones correspondientes a la Figura 34.

Tb (U/ml)	t lisis (min)
0,83	$42 \pm 2$
0,25	$52 \pm 3$
0,05	$60 \pm 3$
0,01	----

A medida que disminuye la concentración de Trb aumenta el tiempo de lisis, la curva se achata y se ensancha. La DO alcanzada con bajas concentraciones de Trb es menor que en ausencia de plasmina ; además con 0,01 U/ml no se observa curva de coagulación y lisis, de modo que la plasmina generada degrada el fibrinógeno antes de formarse la red. Cuando se comparan los resultados de las mismas condiciones pero utilizando menor cantidad de UK, las redes tienen más tiempo para formarse. La plasmina generada más tarde demora más en lisar redes mejor formadas. Pero con bajas concentraciones de Trb (0,05 y 0,01 U/ml) las curvas están muy achatadas, indicando que la lisis comienza antes de concluir la fibrinoformación, ya sea que la red formada y/o el Fbg, se lisan lentamente antes de concluir la polimerización.



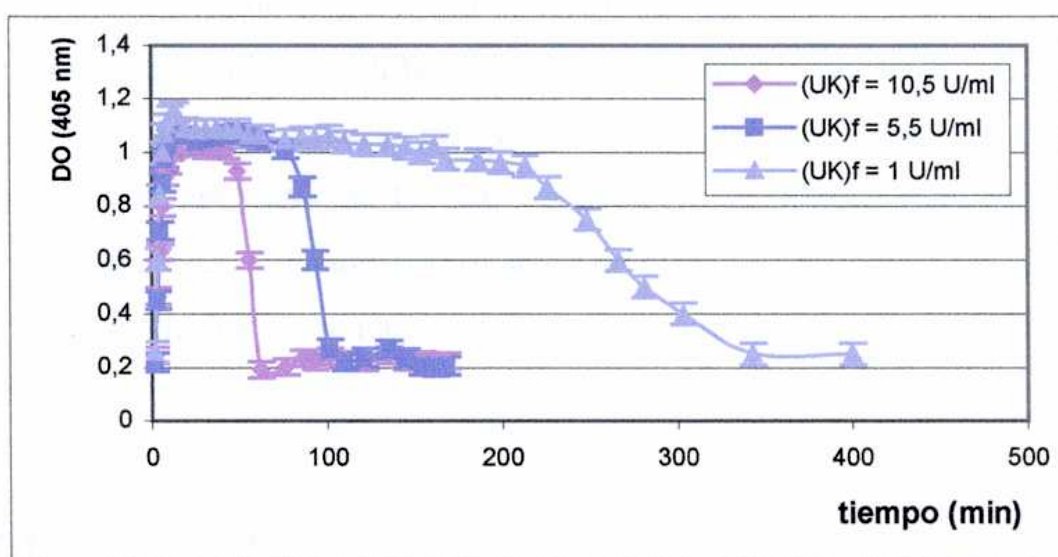
**Figura 35:** Variaciones de (Plg) sobre la formación-lisis de fibrina.

Condiciones: [Tb] = 0,84 U/ml, [Fbg] = 3 g/l, [UK] = 10,5 U/ml

**Tabla 5:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de Plg. Condiciones correspondientes a la Figura 35.

Plg ( $\mu\text{M}$ )	t lisis (min)
1,2	$43 \pm 2$
0,6	$62 \pm 3$
0,3	$77 \pm 3$

Mayor cantidad de Plg corresponde a menor tiempo de lisis, ya que se genera mayor cantidad de plasmina. Vemos además, que aumenta la DO máxima lo que indicaría que el Plg influye en la estructura de la fibrina formada.



**Figura 36:** Variaciones de (UK) sobre la formación-lisis de fibrina.

Condiciones:  $[\text{Fbg}] = 3 \text{ g/l}$ ,  $[\text{Trb}] = 0,84 \text{ U/ml}$ ,  $[\text{Plg}] = 0,6 \mu\text{M}$ .

**Tabla 6:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de u-PA. Condiciones correspondientes a la Figura 36.

[UK] U/ml	t lisis (min)
10,5	$62 \pm 3$
5,5	$102 \pm 7$
1	$350 \pm 11$

Como era de esperar, a mayor cantidad de UK menor tiempo de lisis. Es de destacar que el agregado de UK también modifica la DO máxima sugiriendo cambios en la estructura de la fibrina.

### ***Formación y Lisis de Fibrina Plasmática.***

Se utilizó *PN\** (detalle en Pág. 69) como fuente de fibrinógeno y plasminógeno. En la mayoría de los casos se agregó plasminógeno purificado al plasma, en las concentraciones indicadas en cada ensayo, para asegurar la cantidad suficiente de plasmina.

En una policubeta de fondo plano se colocaron 20  $\mu$ l de una mezcla de trombina,  $\text{CaCl}_2$ , u-PA en buffer Tris-HCl en la dilución adecuada para alcanzar las concentraciones finales deseadas en cada ensayo. Se colocaron las policubetas en un lector de ELISA y a tiempo = 0 se agregaron 100  $\mu$ l de la mezcla plasmática, evitando la formación de burbujas. El registro de los datos y la expresión de los resultados se realizaron como fue descrito para sustancias puras.

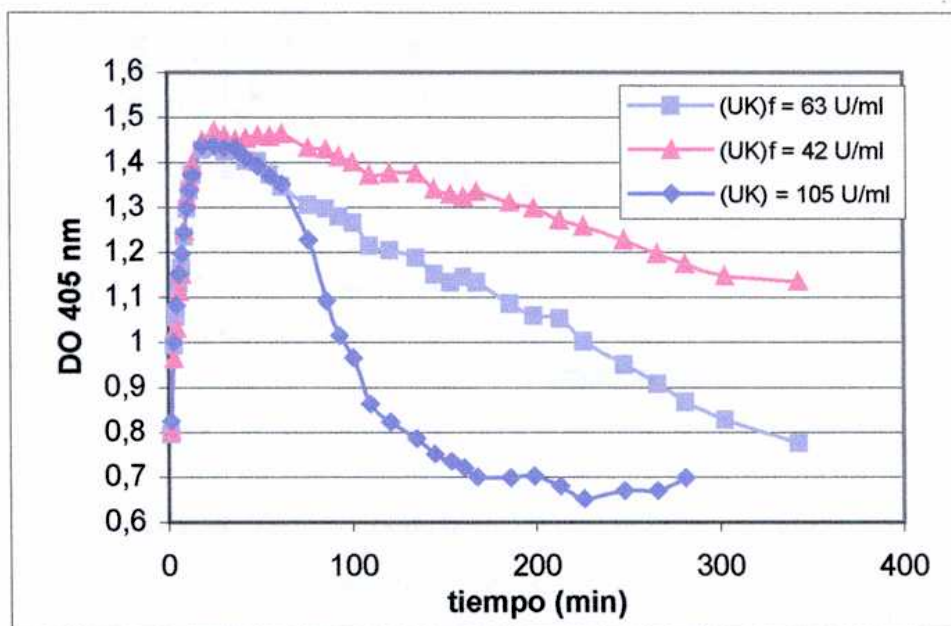
### **Selección de las condiciones experimentales.**

Se realizaron ensayos para medir la velocidad de lisis de redes de fibrina formadas a partir de plasma, utilizando las concentraciones finales que figuran en la tabla 9. En todas las condiciones, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue 33 mM.

**Tabla 7:** Concentraciones ensayadas de los componentes utilizados en la formación y lisis en sistema plasmático.

Trombina (U/ml)	0,24 - 0,84
Dilución del Plasma (%)	50 - 75
Plg agregado ( $\mu$ M)	0 - 0,15 - 0,5 - 1,0 - 1,2 - 2,4
Uroquinasa (U/ml)	43 - 105 - 126 - 168 - 210 - 416 - 833

Se realizaron diluciones de plasma, de modo que la concentración final resultó 75 % y 50 %. Esta última tuvo la intención principal de facilitar la lisis de la fibrina. Estas variaciones diluyen al Fbg y también al Plg, por lo tanto se hicieron ensayos agregando Plg para asegurar la cantidad de plasmina final.



**Figura 37:** Efecto de u-PA sobre la formación-lisis de fibrina plasmática.

Condiciones: [PI] = 75%, [Trb] = 0,84 U/ml, [Plg] = 1,2  $\mu$ M

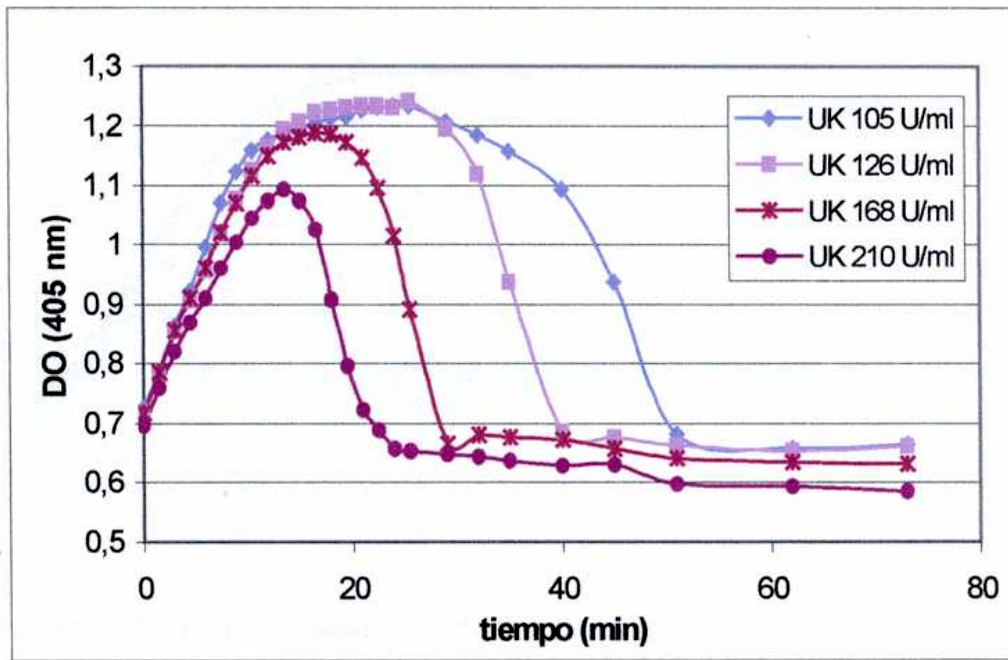
**Tabla 8:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de u-PA.

Condiciones correspondientes a la Figura 37.

(u-PA) U/ml	t lisis (min)
105	168
63	350
42	-----

Se observa que a mayor cantidad de Plg, menor tiempo de lisis. Además, a mayor concentración de plasma (mayor aporte de Fbg) mayor tiempo de lisis.

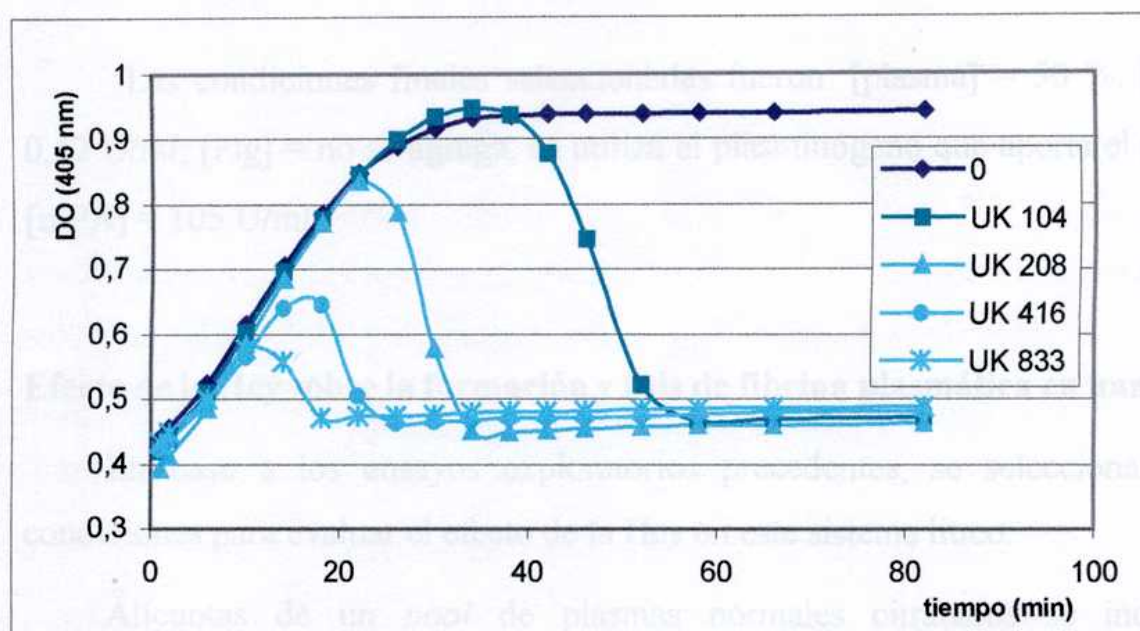




**Figura 38:** Variaciones de la (u-PA) sobre la formación-lisis de fibrina plasmática. [PI] = 50%, [Trb] = 0,84 U/ml, [Plg] ag = 1,2  $\mu$ M.

**Tabla 9:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de u-PA. Condiciones correspondientes a la Figura 38.

[u-PA] (U/ml)	t lisis (min)
104	52 ± 5
126	40 ± 3
168	29 ± 4
210	24 ± 3



**Figura 39:** Fibrinoforrnación-lisis de fibrina plasmática sin agregar Plg.

Condiciones: [plasma] = 50 %; [Tb] = 0,84 U/ml.

**Tabla 10:** Tiempos de lisis final obtenidos con distintas concentraciones de u-PA. Condiciones correspondientes a la Fig 39.

[u-PA] (U/ml)	t lisis (min)
0	-----
104	52 ± 4
208	34 ± 3
416	26 ± 3
833	18 ± 2

El tiempo de lisis disminuye al aumentar la concentración de u-PA utilizada. La figura 39 muestra el efecto de variaciones de la concentración de u-PA en plasma al que no se le ha agregado Plg. Su análisis permite concluir que el Plg aportado por el plasma es suficiente cuando se utilizan concentraciones de UK suficientes que permitan la formación de la red antes de comenzar la fibrinolisis. Se incluye además un control de coagulación, es decir sin agregado de UK.

Las condiciones finales seleccionadas fueron: [plasma] = 50 %; [Trb] = 0,42 U/ml; [Plg] = no se agrega, se utiliza el plasminógeno que aporta el plasma; [u-PA] = 105 U/ml.

### **Efecto de la Hcy sobre la formación y lisis de fibrina plasmática en una etapa.**

En base a los ensayos exploratorios precedentes, se seleccionaron las condiciones para evaluar el efecto de la Hcy en este sistema lítico.

Alícuotas de un *pool* de plasmas normales citratados se incubaron separadamente (a 37 °C, 1 hora) con soluciones frescas de homocisteína en SF, en concentraciones finales (c.f.) = 100, 250 y 500  $\mu$ M. La muestra control se obtuvo reemplazando la solución de Hcy por SF.

A cada una de las muestras plasmáticas modificadas se agregó Trb bovina (c.f.= 0,42 U/ml), CaCl<sub>2</sub> (c.f.= 33 mM) y UK (c.f.= 105 U/ml). Se realizaron estudios cinéticos donde se registró la densidad óptica (DO) a 405 nm, cada 2 minutos hasta valor constante<sup>i</sup> (Reader 100, Organon Teknica, EE.UU.). Los ensayos se realizaron por triplicado, en policubetas de poliestireno.

### **Evaluación de la Fibrinólisis con un Sistema en Dos Etapas**

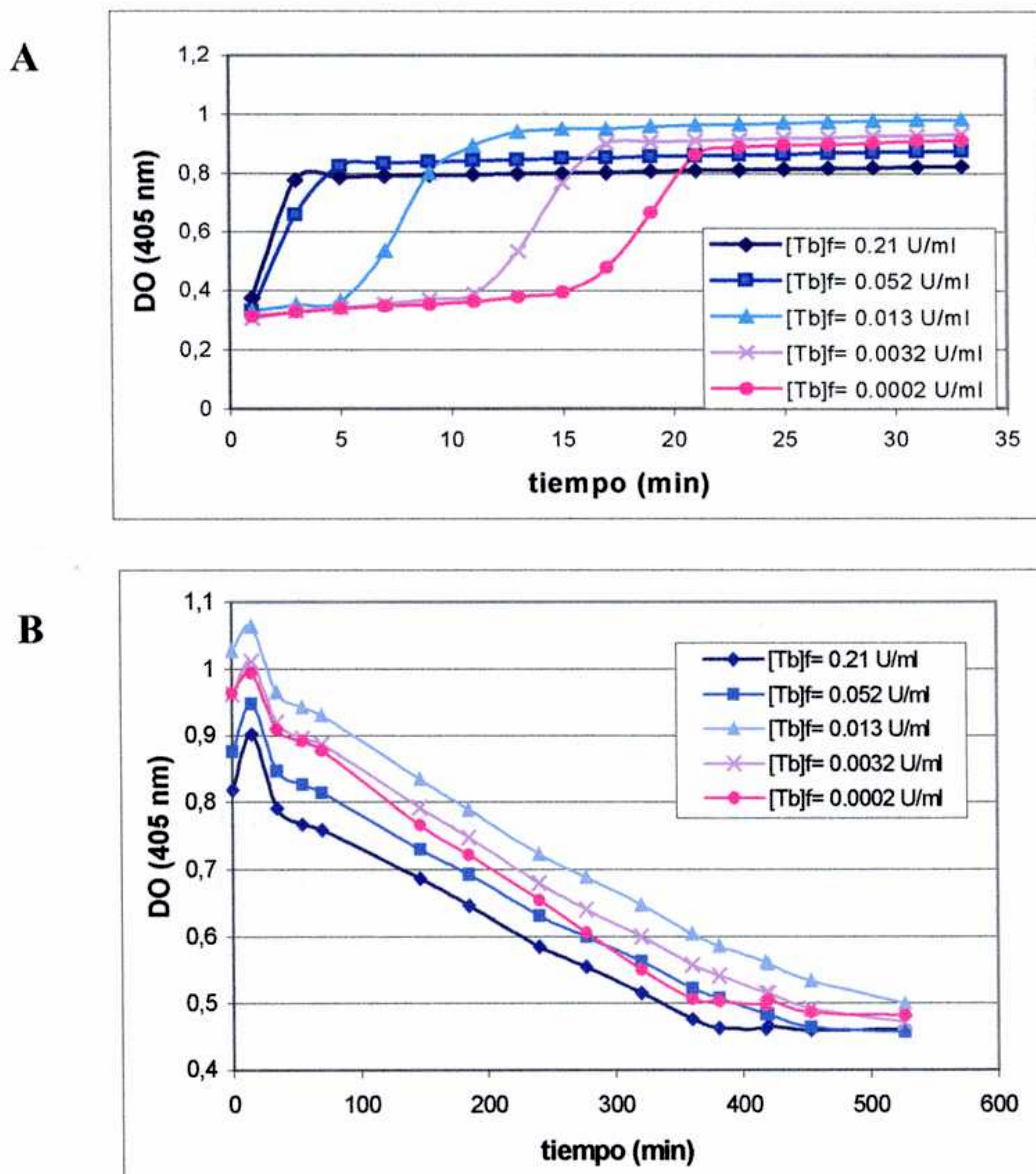
Este sistema permitió separar los procesos de coagulación y fibrinólisis. Si la Hcy se coloca antes de formarse la fibrina se estará evaluando la lisabilidad, como propiedad asociada a la estructura de la fibrina. Si se coloca la Hcy junto con el activador del Plg al analizar la lisis de redes iguales, se evalúa exclusivamente el efecto del aminoácido sobre el sistema fibrinolítico.

Se formaron geles de fibrina como se describió previamente en fibrinoformación. Se colocaron 70  $\mu$ l del activador del plasminógeno (u-PA: 25 U/pocillo o t-PA: 20 U/pocillo) por encima de los geles estabilizados (1 hora a

37°C o 18 horas a 4°C) y se registró la lisis midiendo la DO (405 nm) en función del tiempo.

Este sistema facilitó la lisis de fibrina estabilizada: se colocó una solución del activador encima del gel y se registró la DO (405 nm) en función del tiempo. Este sistema heterogéneo presenta un frente de reacción en la interfase entre la solución del activador y el gel de fibrina: la plasmina formada corta las fibras de la fibrina degradando el gel, de modo que se observa que aumenta el volumen de la solución y disminuye el del gel, descendiendo la DO.

La concentración del activador varía desde la solución inicial agregada hasta incorporar el volumen total del gel. Por lo tanto, la cantidad del activador se expresa en unidades agregadas en cada pocillo en un volumen determinado, en este caso 50 U/pocillo en 70  $\mu$ l. Cuando la concentración inicial del activador es elevada, la activación del Plg es instantánea y la DO en función del tiempo presenta una relación lineal. A baja concentración del activador, el Plg demora un tiempo en activarse, por lo tanto, como la UK se diluye a medida que avanza la lisis, se requiere cada vez más tiempo para generar plasmina y la velocidad de lisis disminuye. En estas condiciones cuando se grafica la DO en función del tiempo se obtiene una hipérbola.



**Figura 40:** A) Formación y B) lisis (en sistema en dos fases) de fibrina obtenida con distintas concentraciones de Trb.

**Tabla 11:** Tiempo de lisis de fibrina obtenidas con distintas

(Tb)final (U/ml)	t lisis (h:min)	t lisis media (h:min)
0,21	6:20	3:20
0,052	7:00	3:50
0,013	8:10	4:05
0,0032	7:20	3:50
0,0002	6:40	3:20

***Lisis de Redes Formadas en Presencia de Hcy.***

Se formaron redes de fibrina plasmática según lo explicado en materiales y métodos, utilizando plasma incubado en presencia de distintas concentraciones de Hcy (c.f. = 500 y 100  $\mu$ M) con Tb (c.f.: 0,25 UI/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (c.f.: 33 mM). Una vez estabilizados los geles (1 h a 37°C) se agregó una solución de u-PA (25 U/pocillo) o de t-PA (20 U/pocillo) en un volumen de 70  $\mu$ l y se monitoreó la DO a 405 nm en función del tiempo.

***Efecto de Hcy sobre la Lisis de Redes Plasmáticas Estándar***

Se formaron redes de fibrina plasmática con plasma diluido (c.f. = 50 %) con *buffer* Tris-NaCl, trombina bovina (c.f. = 25 U/ml), y  $\text{CaCl}_2$  (c.f. = 33 mM), de manera que todas las redes formadas en esta experiencia son iguales. Una vez que las redes fueron estabilizadas (1 h a 37°C), se agregó una mezcla de u-PA (200 U/pocillo) y Hcy (c.f. = 3 mM) o de t-PA (100 U/pocillo) y Hcy (c.f. = 3 mM). Las curvas control se realizaron agregando el activador de Plg con SF.

## ***RESULTADOS***

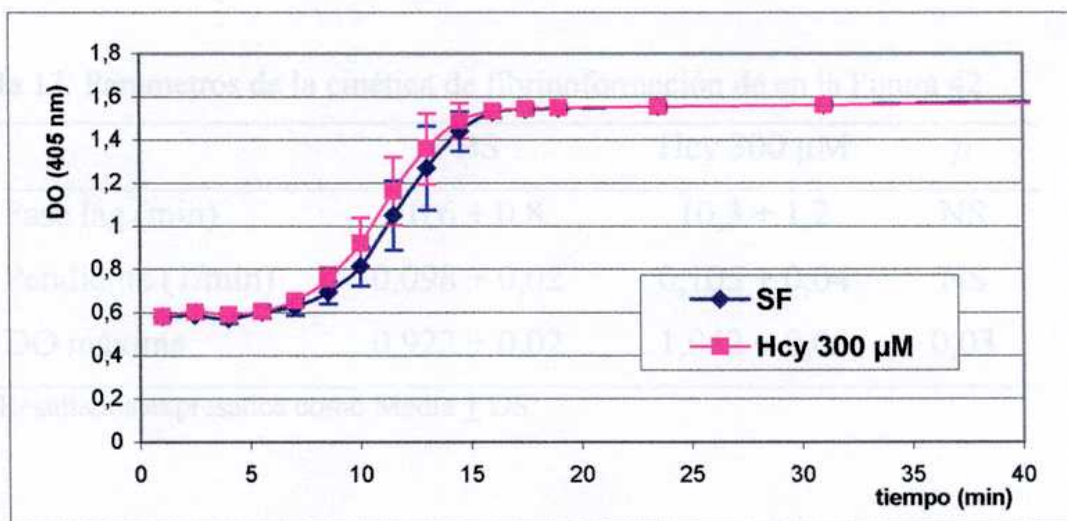
## CINÉTICA DE FIBRINOFORMACIÓN

La acción de la trombina sobre el fibrinógeno en solución produce una serie de eventos que culminan con la formación de un gel, cuyo componente sólido (esqueleto) es la fibrina. Dentro de esos eventos podemos diferenciar la liberación de los fibrinopéptidos y el ensamble de los monómeros de fibrina hasta completar un polímero tridimensional. La formación de la fibrina depende de una serie de factores: temperatura, pH, fuerza iónica del medio, de las concentración de fibrinógeno, trombina y  $\text{Ca}^{2+}$ . En el medio plasmático depende, además, de las concentraciones de inmunoglobulinas, inhibidores de trombina y un conjunto de proteínas que modulan la estructura final de la fibrina, entre las cuales figuran la vitronectina y la fibronectina.

### *Efecto de la Hcy sobre la Cinética de Fibrinoformación*

Se evaluó la cinética de fibrinoformación a partir de *PN\** preincubado con Hcy (c.f. 300 y 500  $\mu\text{M}$ ) por agregado de Trb (c.f.= 0,05U/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (c.f. 33 mM)

En la Figuras 41 están graficados los resultados de la fibrinoformación realizada con  $[\text{Hcy}] = 300 \mu\text{M}$ . Como puede observarse, no se encontraron diferencias entre las curvas obtenidas en presencia de Hcy y las control.



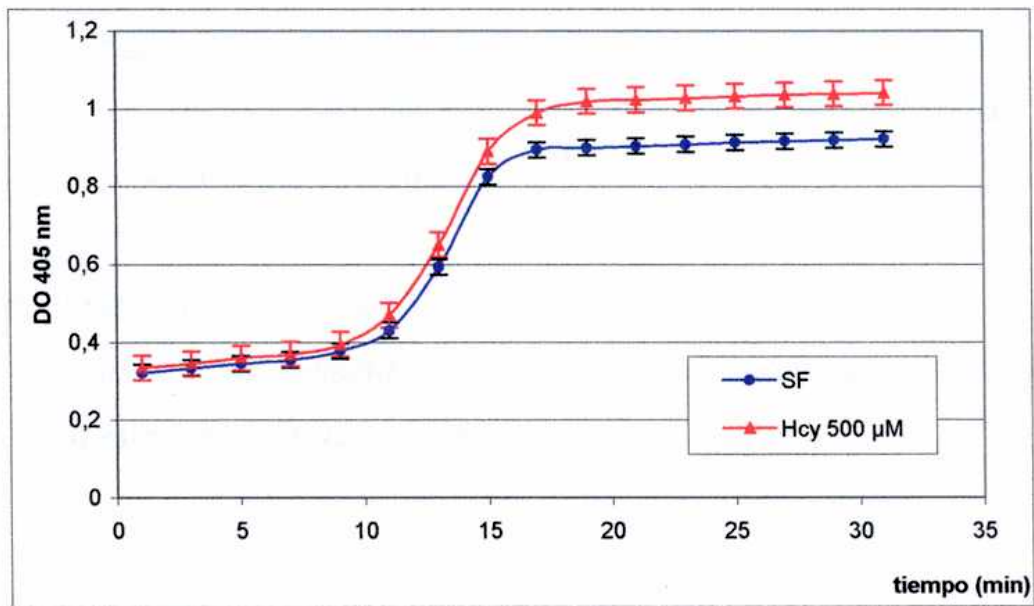
**Figura 41:** Fibrinoformación de plasma preincubado con Hcy 300  $\mu\text{M}$ .



**Tabla 12:** Parámetros de la cinética de fibrinoformación con Hcy 300  $\mu\text{M}$ .

	SF	Hcy 300 $\mu\text{M}$	<i>p</i>
Fase lag (min)	8,6 + 0,8	8,3 + 1	NS
Pendiente (1/min)	0,113 $\pm$ 0,04	0,115 $\pm$ 0,02	NS
DO máxima	1,587 $\pm$ 0,03	1,599 $\pm$ 0,01	NS

Resultados expresados como Media  $\pm$  DS.

**Figura 42:** Fibrinoformación de plasma preincubado con Hcy 500  $\mu\text{M}$ .**Tabla 13:** Parámetros de la cinética de fibrinoformación de en la Figura 42.

	PBS	Hcy 300 $\mu\text{M}$	<i>p</i>
Fase lag (min)	10,6 + 0,8	10,3 + 1,2	NS
Pendiente (1/min)	0,098 + 0,02	0,105 + 0,04	NS
DO máxima	0,922 + 0,02	1,042 + 0,03	0,03

Resultados expresados como Media  $\pm$  DS.

En la Figura 42 se observan los resultados de la cinética de fibrinoformación obtenidos con Hcy 500  $\mu\text{M}$ . Los valores de los parámetros que caracterizan las curvas están resumidos en la tabla 13. Se observa que las pendientes de ambas curvas son semejantes entre sí, lo que indica que la Hcy 500  $\mu\text{M}$  no modificó la velocidad de formación de la fibrina. La  $\text{DO}_{\text{máx}}$  alcanzada con Hcy resultó mayor que la del control, sugiriendo una estructura final más densa. Las curvas de fibrinoformación con Hcy 100  $\mu\text{M}$  fueron comparables a los correspondientes controles en todas las condiciones ensayadas.

Se han utilizados ampliamente curvas de DO en función del tiempo para interpretar variaciones en diferentes etapas de la fibrinoformación<sup>191</sup>, evaluando la función de los carbohidratos en el proceso de ensamble de la fibrina<sup>192,193</sup> o con el fin de estudiar disfibrinogenemias<sup>194,195</sup>.

***Podemos concluir que la Hcy no modificó la liberación de los fibrinopéptidos ni la velocidad de fibrinoformación, aunque podría modificar la estructura resultante de la fibrina.***

## ESTUDIO DE LAS REDES DE FIBRINA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Entre los numerosos factores reportados en la literatura que modifican la estructura de la red de fibrina, figuran las disfibrinogenemias: alteraciones de la molécula de fibrinógeno de pacientes que pueden presentar complicaciones hemorrágicas, así como trombóticas. Estas moléculas modificadas pueden conducir a fibrinas muy débiles e ineficientes o, por el contrario, a densas tramas difíciles de lisar.

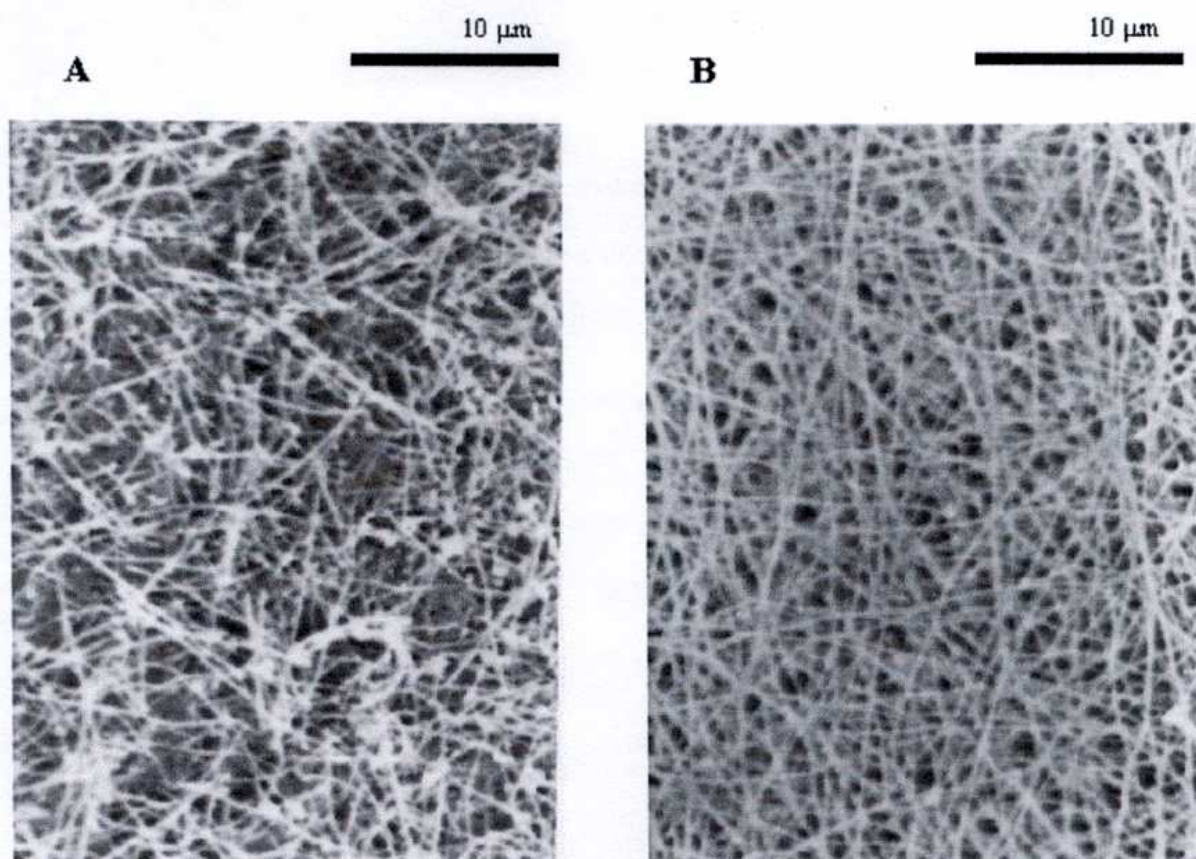
Con el fin de esclarecer si la Hcy produce algún efecto sobre la estructura de redes de fibrina, como lo sugieren las curvas de fibrinoformación, se evaluaron redes de fibrina por microscopía electrónica de barrido, obtenidas a partir de plasmas preincubados con el aminoácido, estabilizadas y procesadas como se detalló previamente en materiales y métodos.

En la Figura 43 se muestran las imágenes de las redes de fibrina obtenidas a partir de plasma preincubado con Hcy 500  $\mu$ M y las correspondientes controles, con un aumento de 3.000 aumentos.

	N	Control	Hcy 500 $\mu$ M	P
N° Fib/campo	10	44 $\pm$ 5	52 $\pm$ 6	0,008
% Red	10	67 $\pm$ 10	79 $\pm$ 8	0,001
Largo ( $\mu$ m)	250	1,04 $\pm$ 0,25	0,68 $\pm$ 0,17	0,001
Ancho ( $\mu$ m)	250	0,17 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,10	0,001

Resultados expresados como promedio y desvío estándar. El análisis estadístico de los resultados se realizó por el método de Mann Whitney - Wilcoxon (para N° Fib/campo y % Red) y el test de Student (para largo y ancho de las fibras).

En la Figura 43 puede observarse que las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy 500  $\mu$ M, resultaron más compactas y ramificadas que las controles.



**Figura 43:** Redes de fibrina plasmática obtenidas por microscopía electrónica de barrido:

A: SF, B: Hcy 500  $\mu$ M.

**Tabla 14:** Caracterización de las redes de fibrina por microscopía electrónica.

	N	Control	Hcy 500 $\mu$ M	<i>p</i>
Nº Fib/campo	10	44 $\pm$ 5	52 $\pm$ 6	0,008
% Red	10	67 $\pm$ 10	79 $\pm$ 8	0,001
Largo ( $\mu$ m)	250	1,04 $\pm$ 0,25	0,68 $\pm$ 0,17	0,001
Ancho ( $\mu$ m)	250	0,17 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,10	0,001

Resultados expresados como promedio y desvío estándar. El análisis estadística de los resultados se realizó por el método de Mann Witney – Wilcoxon (para Nº Fib/campo y % Red) y el test de Student (para largo y ancho de las fibras).

En la Figura 43 puede observarse que las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy 500  $\mu$ M, resultaron más compactas y ramificadas que las controles.

De cada una de las imágenes se evaluaron 10 campos de igual área aleatoriamente seleccionados, donde se midieron el número de fibras por campo, el porcentaje de red (relación porcentual entre el área ocupado por las fibras respecto a la superficie total del campo), largo y ancho de las fibras.

La tabla 14 presenta la caracterización de las redes de fibrina, así como el resultado del análisis estadístico realizado. De ella surge que en presencia de Hcy se forman redes de fibrina que contienen mayor número de fibras/campo y que esas fibras son más gruesas y cortas que las correspondientes a una fibrina control.

## **DISCUSIÓN**

Las imágenes de microscopía electrónica mostraron que las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy estaban formadas por mayor número de fibras/campo y mayor porcentaje de red, ambas diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados indican que las fibras de fibrina están ocupando mayor superficie que las controles (aproximadamente 20 %) resultando redes más densas o compactas. Resultados semejantes se obtuvieron con Hcy 300  $\mu\text{M}$  y trombina 0,05 U/ml<sup>14</sup>.

El aumento significativo de la DO<sub>máxima</sub> (Figura 42) permitió sugerir que la Hcy podría generar cambios estructurales en la fibrina. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (Figura 43, tabla 14) apoyan esta hipótesis en la sección de fibrinoformación con Hcy 500  $\mu\text{M}$ .

Sauls y colaboradores mostraron imágenes obtenidas por MEB, de fibrina de plasmas de conejos inyectados intraperitonealmente con DL-Hcy. Esta forma de incorporar el aminoácido al plasma de los conejos es muy parecida a agregarle *in vitro* a un plasma normal una solución de DL-Hcy. A semejanza de nuestros resultados, estos autores muestran que los coágulos plasmáticos de animales hiperhomocisteinémicos parecen estar compuestos por fibras más densamente

empaquetadas. En cambio, el promedio de los diámetros mostrados en el trabajo, resultaron significativamente inferiores al control ( $185 \pm 14$  vs  $218 \pm 15$  nm). Sin embargo visualmente se observan fibras de distintos diámetros, muchas de ellas más gruesas que las observadas en los controles. Detallan en materiales y métodos que las fibras fueron medidas “en su punto más ancho, donde no había un punto de ramificación”. Esto sugiere una contradicción, que hace dudar de la forma en que los diámetros fueron medidos en una trama tan densa. Tal vez muchas fibras no fueron medidas por considerarse ramificaciones.

***Se puede concluir que la Hcy produjo cambios en la estructura de la fibrina plasmática, generando redes compactas y ramificadas, formadas por fibras más cortas y gruesas que las del control.***

#### *TEG de Sangre Entera Anticoagulada*

Se realizó el TEG utilizando sangre citrada de individuos cuyos valores hematimétricos, recuento plaquetario, TP, APTT y concentración de Fbg se encontraban dentro del rango normal. Se incubaron previamente (1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ ), 9 partes de sangre citrada + 1 parte de solución de Hcy de diferentes concentraciones, o solución fisiológica como control de modo que la concentración de Hcy final agregada fue 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . En los trazados resultantes se determinaron cada uno de los parámetros del TEG ( $\alpha$ ,  $\text{A}$ ,  $\text{ms}$ ,  $\theta$ ).

A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos a partir de la sangre de un individuo.

## TROMBOELASTOGRAMA

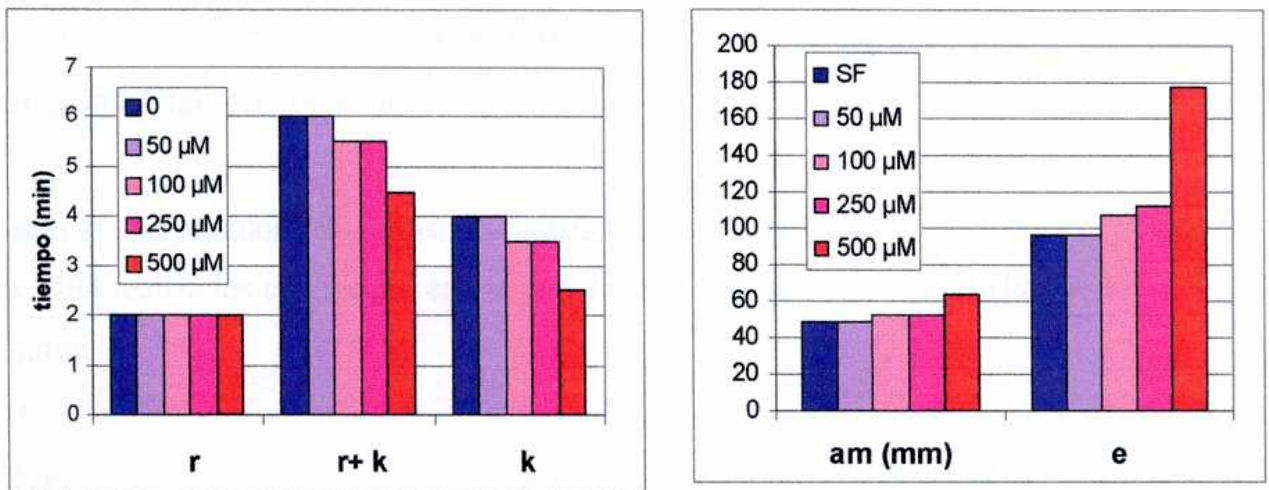
El estudio cinético de la formación de la fibrina también puede ser evaluado mediante el tromboelastograma (TEG). Este registro muestra los cambios dinámicos en la formación y rigidez de los coágulos, complementando la información que aportan las pruebas globales. Dentro de una visión integral del proceso de coagulación, el TEG permite evaluar el tiempo que demora la aparición de la fibrina, la velocidad de la fibrinoformación y las características del trombo formado. Generalmente se utilizan con muestras de sangre entera recalcificada, aunque puede utilizarse también con plasma.

Dado los cambios detectados en las pruebas precedentes, se pensó que la realización de tromboelastogramas con muestras de sangre y plasma preincubadas con Hcy resultaría adecuada para detectar posibles variaciones, ya sea en la etapa previa a la formación de la fibrina, la velocidad de ensamble del polímero o su estructura resultante. (*En materiales y métodos (Pág. 80) se definen los parámetros del TEG y su interpretación*).

### ***TEG de Sangre Entera Anticoagulada***

Se realizaron TEG utilizando sangre citratada de individuos cuyos valores hematimétricos, recuento plaquetario, TP, APTT y concentración de Fbg se encontraban dentro del rango normal. Se incubaron previamente (1 hora a 37° C), 9 partes de sangre citratada + 1 parte de solución de Hcy de diferentes concentraciones, o solución fisiológica como control, de modo que la concentración de Hcy final agregada fue 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . En los trazados resultantes se determinaron cada uno de los parámetros del TEG ( $r$ ,  $k$ ,  $am$ ,  $\epsilon$ ).

A modo de **ejemplo** se muestran los resultados obtenidos a partir de la sangre de un individuo.



**Figura 44:** Efecto de distintas concentraciones de Hcy sobre los parámetros del TEG realizado con sangre anticoagulada de un individuo normal.

**Tabla 15:** Parámetros del TEG realizado con sangre anticoagulada de un individuo normal preincubada con distintas concentraciones de Hcy.

[Hcy]	$r$ (min)	$r+k$ (min)	$k$ (min)	$am$ (mm)	$\varepsilon$	$\Delta\varepsilon$
0	2	6	4	49	96	-
50 μM	2	6	4	49	96	0
100 μM	2	5,5	3,5	52	108	10
250 μM	2	5,5	3,5	53	113	18
500 μM	2	4,5	2,5	64	178	80

Como puede observarse, a medida que aumenta la concentración de Hcy se detecta la disminución de  $k$ , el incremento de  $am$  y  $\varepsilon$ , mientras  $r$  permanece constante.



Las variaciones de los parámetros del TEG obtenidos a partir de sangre de 10 individuos normales fueron evaluadas estadísticamente por el test Wilcoxon (programa Statistix for Windows).

**Tabla 16:** Resultados del Análisis Estadístico (Test de Wilcoxon) de los parámetros de los TEG realizados con sangre entera con distintas concentraciones de Hcy respecto al control.

**$\Delta r$**

[Hcy]	50 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	250 $\mu\text{m}$	500 $\mu\text{m}$
$\Sigma$ diferencias +	-2	-11	-5	-1,5
$\Sigma$ diferencias -	0,5	10	5	4,5
Sin diferencias	5	2	2	4
Promedio de las diferencias	-0,21	-0,21	-0,03	-0,14
<i>p</i> a 1 cola	NS	NS	NS	NS

**$\Delta k$**

[Hcy]	50 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	250 $\mu\text{m}$	500 $\mu\text{m}$
$\Sigma$ diferencias +	2	2	1,5	0
$\Sigma$ diferencias -	-13	-19	-10,5	-15
Sin diferencias	2	2	1	2
Promedio de las diferencias	-0,97	-1,04	-1,07	-1,29
<i>p</i> a 1 cola	NS	<i>p</i> = 0,0469	<i>p</i> = 0,046	<i>p</i> = 0,0312

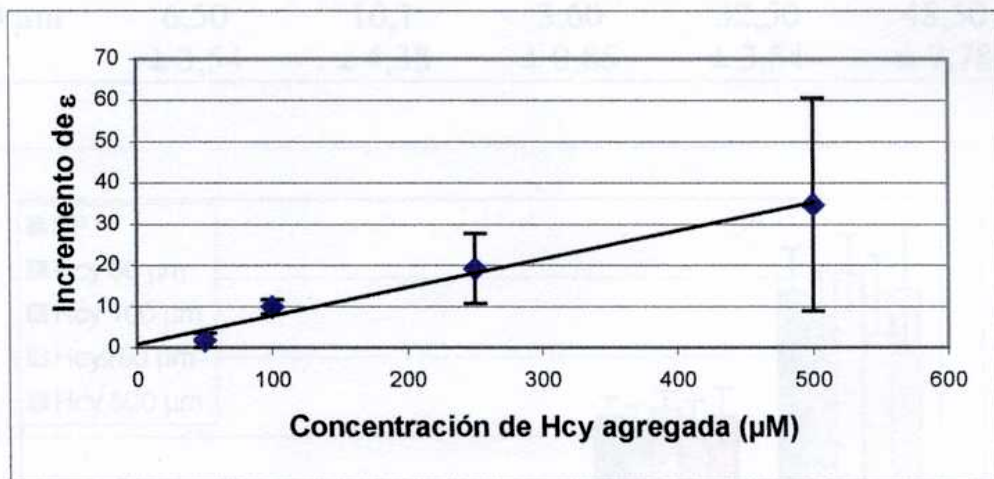
**$\Delta \epsilon$**

[Hcy]	50 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	250 $\mu\text{m}$	500 $\mu\text{m}$
$\Sigma$ diferencias +	20	20	14	28
$\Sigma$ diferencias -	-1	-1	-1	0
Promedio de las diferencias	14,21	12,44	15,68	39,14
Sin diferencias	1	2	1	0
<i>p</i> a 1 cola	<i>p</i> = 0,0312	<i>p</i> = 0,0312	<i>p</i> = 0,0297	<i>p</i> = 0,0078

Los TEG de individuos cuyos niveles hematimétricos (GR, GB, plaq, Hb) y hemostáticos (TP, APTT y Fbg) se encontraban dentro de los VN, no mostraron variaciones de  $r$ , mientras que la disminución de  $k$  presentó diferencias significativas cuando se agregaron concentraciones de Hcy superiores a 100  $\mu\text{M}$ .

No se encontró relación entre la variación de  $k$  (tiempo necesario para alcanzar un trombo de am preestablecida) y la concentración de Hcy. Dado que  $r$  no mostró diferencias con el agregado de Hcy, la disminución de  $k$  estaría asociada a variaciones en la velocidad de formación del trombo.

Los incrementos de  $\varepsilon$  (módulo de solidez relativo) aumentan su significancia al aumentar la concentración de Hcy agregada (Figura 45).



**Figura 45:** Variación de  $\varepsilon$  de los TEG de sangre entera en función de la concentración de Hcy agregada.

Como puede observarse,  $\varepsilon$  aumentó proporcionalmente a la concentración de Hcy agregada, indicando que la Hcy aumenta la rigidez del trombo de sangre entera en forma dosis dependiente.

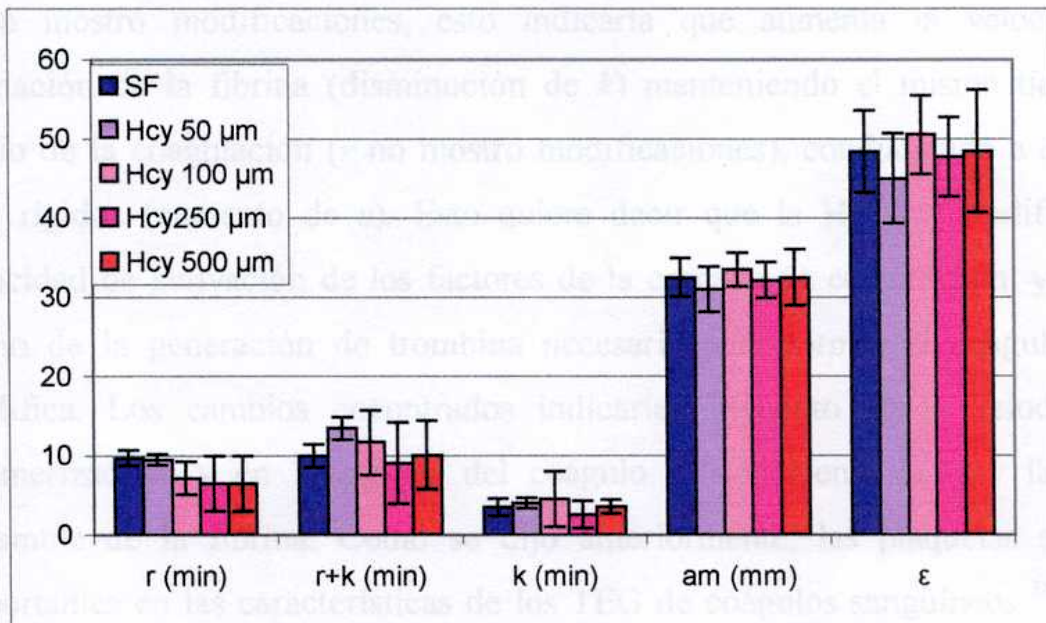
## DISCUSIÓN

### TEG Plasmático

Cuando se realizaron los TEG con  $PN^*$  preincubados con diferentes concentraciones de Hcy no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas.

**Tabla 17:** Efecto de diferentes cantidades de Hcy agregada sobre los parámetros de los TEG plasmáticos.

	r (min)	r+k (min)	k (min)	am (mm)	$\epsilon$
SF	9,7 ± 1,00	10,00 ± 1,47	3,50 ± 1,08	32,50 ± 2,42	48,37 ± 5,18
Hcy 50 $\mu\text{m}$	9,5 ± 0,71	13,50 ± 1,41	4,00 ± 0,71	31,00 ± 2,83	45,00 ± 5,66
Hcy 100 $\mu\text{m}$	7,17 ± 2,02	11,67 ± 4,04	4,50 ± 3,50	33,50 ± 2,12	50,50 ± 4,95
Hcy 250 $\mu\text{m}$	6,5 ± 3,50	9,07 ± 5,15	2,57 ± 1,68	32,17 ± 2,25	47,70 ± 5,00
Hcy 500 $\mu\text{m}$	6,50 ± 3,54	10,1 ± 4,38	3,60 ± 0,85	32,50 ± 3,54	48,50 ± 7,78



**Figura 46:** Efecto de Hcy sobre los parámetros del TEG plasmático.

## DISCUSIÓN

Si bien el tromboelastógrafo informa sobre la cinética de la coagulación y fibrinólisis en relación a la calidad y cantidad de sus componentes, tiene un valor adicional sobre otros instrumentos porque aporta información sobre las características del coágulo. Dadas las diferencias encontradas en las redes de

fibrina plasmáticas por acción de la Hcy fue interesante determinar el efecto del aminoácido sobre los parámetros del TEG.

El trazado del tromboelastograma de sangre entera es dependiente de la combinación de muchos factores individuales, especialmente número y funcionalidad plaquetaria, así como volumen celular, concentración de Fbg, factores y demás componentes que intervienen en la coagulación.

Para establecer si la Hcy produce variaciones detectables en el TEG, fue necesario evaluar sangre de diferentes individuos y determinar las posibles variaciones en cada uno de los parámetros evaluados. Por esto se incubaron (1 h, 37°C) alícuotas de sangre entera con solución de Hcy de modo que la [Hcy] final agregada fue de 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Se realizaron los TEG con las muestras preincubadas.

El incremento de Hcy produjo disminución de  $k$  y aumento de  $\varepsilon$ , mientras  $r$  no mostró modificaciones, esto indicaría que aumenta la velocidad de formación de la fibrina (disminución de  $k$ ) manteniendo el mismo tiempo de inicio de la coagulación ( $r$  no mostró modificaciones), conduciendo a coágulos más rígidos (aumento de  $\varepsilon$ ). Esto quiere decir que la Hcy no modificaría la velocidad de activación de los factores de la cascada de coagulación, ya que el inicio de la generación de trombina necesaria para formar el coágulo no se modifica. Los cambios encontrados indicarían aumento en la velocidad de polimerización, y en la rigidez del coágulo. Posiblemente la Hcy facilite el ensamble de la fibrina. Como se dijo anteriormente, las plaquetas son muy importantes en las características de los TEG de coágulos sanguíneos<sup>186, 196</sup>. Si bien la Hcy no produjo cambios en el sistema de plaquetas aisladas<sup>14</sup> no puede descartarse la interacción entre eritrocitos, plaquetas, Fbg y Trb.

La solidez relativa del trombo ( $\varepsilon$ ) aumentó proporcionalmente a la concentración de Hcy agregada, indicando que la Hcy aumenta la rigidez del trombo de sangre entera en forma dosis dependiente. El TEG evalúa reológicamente a las muestras en condiciones de “no linealidad”, por lo tanto el

parámetro  $\epsilon$  indica la resistencia del coágulo cuando se aplica a una gran deformación.

Estos resultados, a pesar de estar realizados en sangre entera, son coincidentes con los encontrados por seguimiento espectrofotométrico de la fibrinoformación plasmática. Sin embargo, cuando se analizaron los TEG de *PN\** preincubados con diferentes concentraciones de Hcy no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas. El *PN\** están desplaquetizados, era de esperar que las amplitudes de los TEG resultaran pequeñas (mucho menores que la de los trazados obtenidos con sangre entera), de modo que sus desvíos estándar no permitieron detectar posibles modificaciones producidas por la Hcy en estos coágulos (tabla 17).

Las determinaciones utilizando la sangre entera de un individuo incubada con las distintas concentraciones de Hcy, deben procesarse en el día. Por lo tanto excepcionalmente se realiza un duplicado. Mientras que las muestras plasmáticas, al mantenerse congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de usarlas, permiten realizar varias determinaciones. El análisis estadístico de los datos de sangre entera permite evaluar los efectos de la Hcy sobre la sangre de distintos individuos, mientras que el análisis estadístico de los datos plasmáticos evalúa “además” del efecto de la Hcy, la variabilidad del método, ya que los cálculos se realizan con varios resultados de la misma muestra.

No hay reportes bibliográficos que analicen el efecto de la Hcy sobre el TEG (de sangre entera ni de plasma) que nos permitan comparar estos resultados, aunque se disponen de algunos trabajos que han sido de utilidad para reafirmar su interpretación. Gunther y colaboradores<sup>120</sup> utilizaron al TEG para evaluar el efecto de distintos surfactantes sobre las características del coágulo, asociando la reducción de la amplitud máxima con la disminución de la rigidez del trombo.

Mediante el TEG se pudieron realizar seguimientos cinéticos con sangre entera, evaluando el efecto de la Hcy en un sistema más cercano al fisiológico (ya que incluye células y plaquetas) y se aproxima al que sistema *in vivo*.

*Los resultados de los TEG indicaron que el incremento de Hcy aumentó la velocidad de formación de la fibrina en sangre entera, manteniendo el mismo tiempo de inicio de la coagulación. Se formaron, a su vez, coágulos cuya rigidez, o resistencia a las grandes deformaciones, aumentó linealmente con la concentración de Hcy.*

*No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas de los TEG de plasmas normales preincubados con Hcy.*

## REOMETRÍA

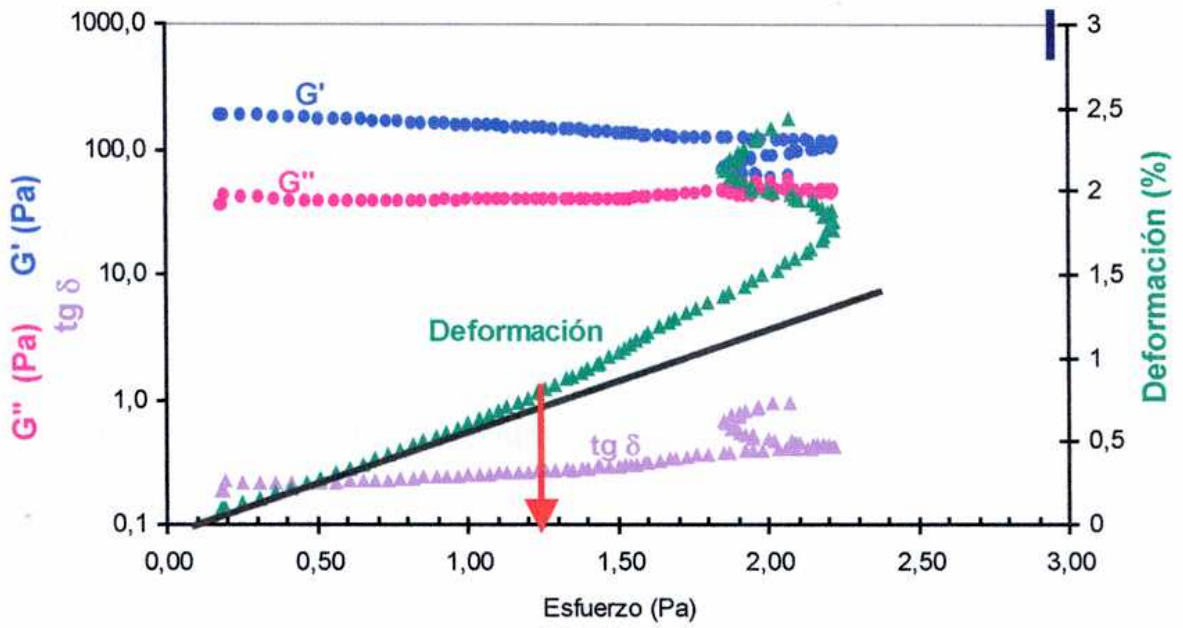
La microscopía electrónica reveló que la Hcy produjo diferencias en las redes de fibrina, que fueron procesadas para su observación. El tromboelastograma evidenció modificaciones en los coágulos de sangre entera, pero no detectó cambios en los geles de plasmas preincubados con Hcy.

Con el objeto de determinar si la calidad de los trombos que pudieran formar los pacientes hiperhomocisteinémicos difieren de la de los normales solamente debido al aumento de la concentración de Hcy, se realizaron diversos estudios en un reómetro de esfuerzo tangencial controlado. Estos ensayos permitieron obtener información sobre la respuesta de los “geles de fibrina” a pequeñas deformaciones (sin alterar su estructura), a diferencia del TEG que informa sobre la resistencia de los coágulos sometidos a grandes deformaciones.

### Selección de las condiciones experimentales

El comportamiento mecánico de la estructura intacta de los geles se evalúa mediante los valores de  $G'$  (módulo elástico),  $G''$  (módulo viscoso) y  $\tan \delta$  (relación  $G''/G'$ ). Estos parámetros se determinan en barridos de frecuencia a deformación constante. La deformación a aplicar en estos ensayos debe determinarse previamente. Por lo tanto, para explorar el comportamiento viscoelástico de las distintas muestras y determinar las condiciones de trabajo, en primer lugar se realizaron, por triplicado, barridos de esfuerzo a frecuencia constante, a 3 frecuencias diferentes: 0,01; 0,1 y 1 Hz.

Como puede observarse en la figura 47,  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  permanecieron constantes mientras la deformación varió linealmente con el esfuerzo tangencial aplicado. A esfuerzos mayores la relación se aparta de la linealidad y los valores de  $G'$  y  $G''$  varían, indicando que el material comienza a alterarse. A partir de estos ensayos se determinó el rango de comportamiento viscoelástico lineal de cada muestra, es decir el intervalo de esfuerzo donde la relación esfuerzo/deformación permanece constante y cuyo límite superior está indicado por la flecha roja. Para cada muestra el comportamiento viscoelástico lineal fue observado en distintos intervalos de esfuerzo tangencial (Tabla 18).



**Figura 47:** Barrido de esfuerzo a frecuencia constante ( $\nu = 1$  Hz)

**Tabla 18:** Valores máximos de esfuerzo tangencial que cumplen la relación viscoelástica lineal en geles con distintas concentraciones de Hcy.

Muestra	Valor máximo de esfuerzo sin disrupción estructural(Pa)
PBS (control)	0,30
[Hcy] = 100 $\mu$ M	1,30
[Hcy] = 250 $\mu$ M	1,55
[Hcy] = 500 $\mu$ M	1,55

(n=3)

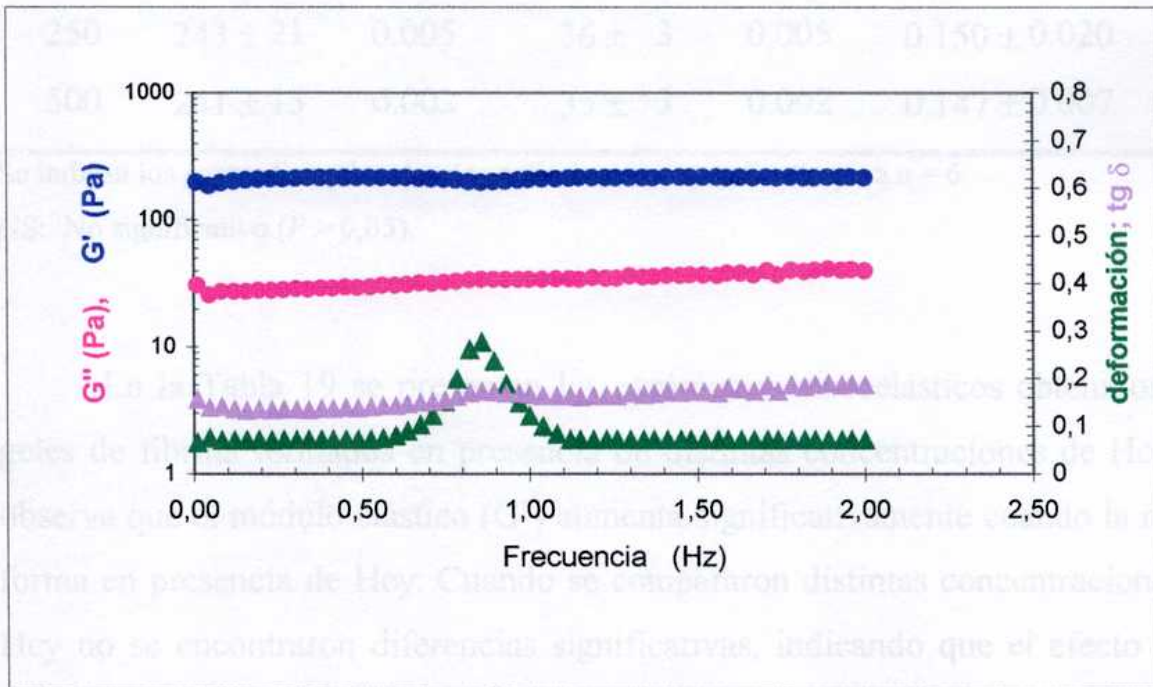
Como se observa en la tabla, con la presencia de Hcy aumenta el esfuerzo que puede ser aplicado en un ensayo dinámico sin disrupción estructural. Esto indica que, en presencia de concentraciones crecientes de Hcy se obtiene un gel que puede ser representado mecánicamente por una componente elástica cada vez más rígida.



Se eligió, además, la deformación constante con que se iba a trabajar en los barridos de frecuencia: el valor seleccionado fue 0,07%, suficientemente bajo para permitir el estudio de todas las muestras, incluso las más delicadas, antes que se produzcan alteraciones estructurales.

### **Efecto de la Hcy sobre los Parámetros Reométricos**

Una vez que se seleccionaron las condiciones experimentales se realizaron los barridos de frecuencia con los geles de fibrina obtenidos a partir de *PN\** preincubados con las distintas concentraciones de Hcy. La Figura 48 muestra, un experimento tipo.



**Figura 48:** Barrido de frecuencia a deformación constante = 0,07%.

Observando los barridos de frecuencia de los distintos geles, pudo verse que  $G'$  y  $G''$  resultaron independientes de la frecuencia dentro del intervalo 0,01-2 Hz, en “todas” las muestras ensayadas. Los valores de  $G'$  resultaron mayores a los de  $G''$  para todas las concentraciones de Hcy ensayadas. Estos resultados indican que las muestras tienen la estructura de un sólido verdadero. Podemos interpretar que el módulo sólido o elástico  $G'$  está evaluando la “red de fibrina” (componente sólido del gel), mientras que los valores del módulo viscoso o

fluido  $G''$  caracterizan el componente fluido del sistema (compartimentalizado por dicha red). A frecuencia mayores,  $G'$  y  $G''$  no se mantuvieron constantes, probablemente debido a perturbaciones de la estructura.

**Tabla 19:** Parámetros obtenidos de los barridos de frecuencia realizados a deformación constante (0,07%) con las distintas muestras.

Hcy ( $\mu\text{M}$ )	$G'$ (Pa)	$p$	$G''$ (Pa)	$p$	$\text{tg } \delta$	$p$
0	$178 \pm 30$	-----	$24 \pm 2$	-----	$0.150 \pm 0.020$	-----
50	$254 \pm 10$	0.012	$32 \pm 1$	0.012	$0.130 \pm 0.007$	NS
100	$252 \pm 40$	0.012	$33 \pm 2$	0.012	$0.130 \pm 0.020$	NS
250	$243 \pm 21$	0.005	$36 \pm 3$	0.005	$0.150 \pm 0.020$	NS
500	$241 \pm 13$	0.002	$35 \pm 3$	0.002	$0.147 \pm 0.007$	NS

Se indican los promedios y los desvíos estándar correspondientes para  $n = 6$ .

NS: No significativo ( $P > 0,05$ ).

En la Tabla 19 se presentan los parámetros viscoelásticos obtenidos con geles de fibrina formados en presencia de distintas concentraciones de Hcy. Se observa que el módulo elástico ( $G'$ ) aumenta significativamente cuando la red se forma en presencia de Hcy. Cuando se compararon distintas concentraciones de Hcy no se encontraron diferencias significativas, indicando que el efecto de la Hcy no es concentración-dependiente entre 50 y 500  $\mu\text{M}$ . Se obtuvieron resultados semejantes a partir de los valores del módulo viscoso ( $G''$ ).

Los valores de  $\text{tg } \delta$  obtenidos no variaron significativamente entre 0 y 500  $\mu\text{M}$ , lo que indica que el aumento de  $G''$  acompañó proporcionalmente al de  $G'$ , de modo que, se mantuvo la proporción entre las propiedades viscosas/elásticas del coágulo.

En la figura 14 puede verse, además, el registro de la deformación que experimentó el equipo durante el ensayo. Independientemente de que entre las

condiciones seleccionadas en el equipo, se ajustó deformación constante (0,07 %), en todos los casos se registró un pico que habitualmente no se observa en los ensayos dinámicos de sólidos verdaderos. La frecuencia e intensidad del mismo resultaron reproducibles dentro de cada lote y parecerían características de cada muestra. En la Tabla 20 figuran los promedios y desvíos estándar de las frecuencias e intensidades a las que se producen los picos de deformación de cada concentración de Hcy ensayada.

**Tabla 20:** Valor de frecuencia al que aparece el pico de deformación que se manifiesta durante los barridos de frecuencia de cada muestra.

Homocisteína ( $\mu\text{M}$ )	Frecuencia (Hz)	Deformación (%)*
0	0,73 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,05
50	0,88 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03
100	0,87 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,02
250	0,88 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,03
500	0,88 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,04

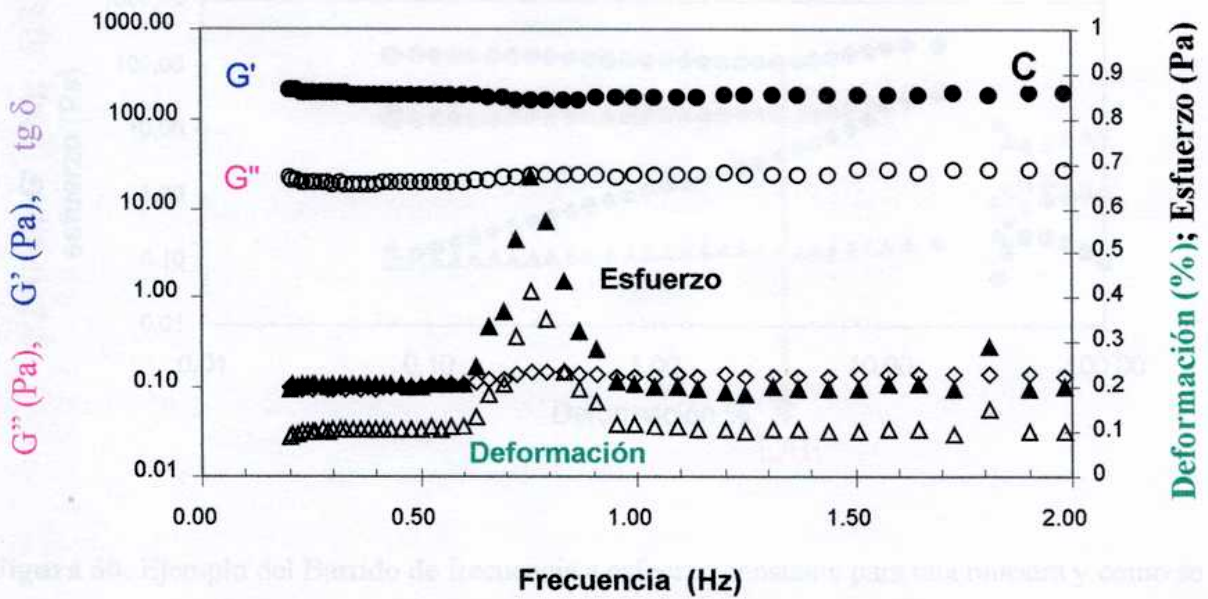
Condiciones de viscoelasticidad lineal: Deformación constante = 0,07%.

\*Intensidad del pico de deformación registrado a la frecuencia indicada.

Nº de muestras de cada lote = 6

Los picos con Hcy se obtuvieron a una frecuencia significativamente superior al control y una intensidad inferior ( $p < 0.05$ ). La variación de ambos parámetros resultó independiente de la concentración del aminoácido.

La aparición de estos picos podría deberse a una relajación de la muestra ocurrida como consecuencia del ensayo o bien ser una verdadera respuesta del material. Para dilucidarlo, se realizaron ensayos de barrido de frecuencia a esfuerzo constante (en lugar de mantener constante la deformación), siempre en condiciones de linealidad (sin romper la estructura) dando, además, tiempo suficiente entre cada medición para que la muestra relaje la energía acumulada durante el ensayo.

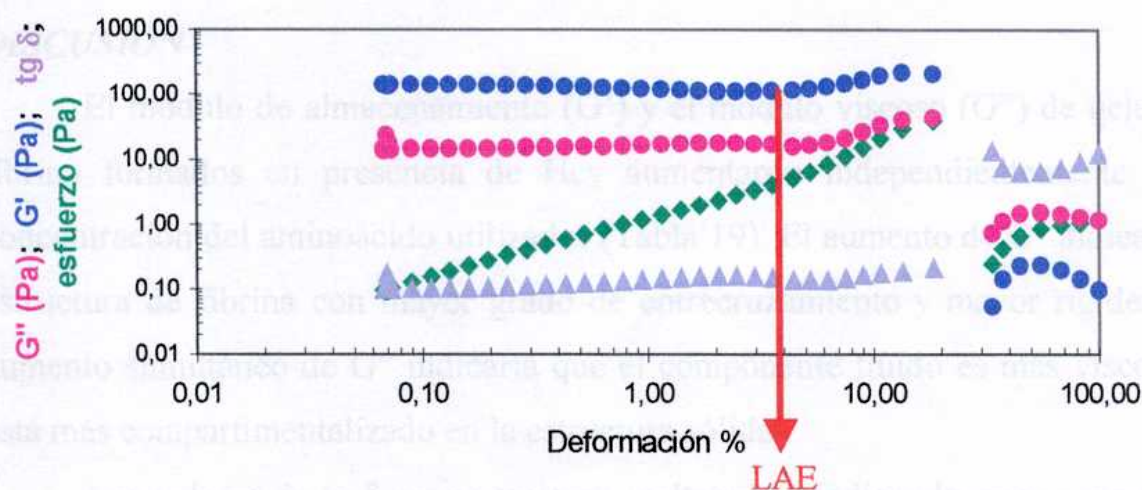


**Figura 49:** Barrido de frecuencia a esfuerzo constante.

Tiempo entre mediciones: 5 minutos.

Como puede verse en la figura 49, se registró también un pico de esfuerzo a una frecuencia característica para cada muestra. Por lo tanto, podemos descartar una relajación estructural debida al ensayo. En consecuencia, el pico de deformación (o de esfuerzo, según el ensayo) observado en cada barrido de frecuencia podría deberse a la resmancia de la estructura de la red, a una frecuencia determinada.

En un intento por establecer la resistencia del coágulo a la deformación, se hicieron, además, ensayos de barrido de deformación a frecuencia constante, con el objeto de determinar la respuesta mecánica del gel a deformaciones crecientes. Este ensayo se realizó por triplicado. En la figura 16 se observa el comportamiento de los geles a la deformación tangencial aplicada a una frecuencia constante de 0,1 Hz. Los valores de deformación a los que los geles se apartan de las condiciones de viscoelasticidad lineal (relación deformación/esfuerzo = constante), están resumidos en la Tabla 21.



**Figura 50:** Ejemplo del Barrido de frecuencia a esfuerzo constante para una muestra y como se obtiene el Límite de alteración estructural (LAE).

**Tabla 21:** Porcentajes de deformación máximo que muestran condiciones de viscoelasticidad lineal (deformación/esfuerzo = constante). n = 3

Homocisteína (μM)	Límite de alteración estructural (% Deformación)	p
0	1,0 ± 0,1	
50	3,6 ± 0,1	0,0001
100	3,0 ± 0,2	0,0001
250	3,0 ± 0,2	0,0001
500	1,7 ± 0,1	0,0008

Se observó que el valor de deformación al cual la muestra se aparta de la linealidad (límite de alteración estructural LAE) aumenta significativamente cuando el gel se forma en presencia de Hcy, indicando que estos gels soportan mayor deformación sin modificar su estructura.

## DISCUSIÓN

El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) de geles de fibrina formados en presencia de Hcy aumentaron independientemente a la concentración del aminoácido utilizadas (Tabla 19). El aumento de  $G'$  indica una estructura de fibrina con mayor grado de entrecruzamiento y mayor rigidez. El aumento simultáneo de  $G''$  indicaría que el componente fluido es más viscoso y está más compartimentalizado en la estructura sólida.

Los valores de  $\tan \delta$  permanecieron inalterados, indicando que se mantuvo la proporción entre las propiedades viscosas/elásticas del gel.

No se ha reportado ningún trabajo que haya evaluado el efecto de la Hcy sobre las características reométricas de geles de fibrina.

Si bien las constantes reométricas obtenidas no son características "absolutas" de los geles estudiados, sirven con fines comparativos. Los valores de  $G'$  y  $G''$  de los geles control son semejantes a los reportados por otros autores<sup>197,198</sup>, teniendo en cuenta las variaciones en las condiciones utilizadas que modifican la fibrina resultante (concentraciones de Fbg, Trb, Ca, FXIII; selección de platos reométricos utilizados, etc).

Se ha reportado que la dureza final del coágulo depende de una serie de características estructurales de la fibrina, como el grosor de las fibras, la densidad de puntos de ramificación y la concentración de fibrina<sup>199</sup>.

La concentración de fibrinógeno es un factor fundamental que produce importantes cambios en la deformabilidad del coágulo<sup>106, 107</sup>. El  $G'$  de geles plasmáticos está relacionado en forma directa con la concentración de fibrinógeno<sup>198, 200</sup> o, dicho de otra forma: plasmas que contienen mayor concentración de fibrinógeno originan coágulos más rígidos.

Otro factor importante en la deformabilidad de la fibrina son las alteraciones en la estructura de fibrinógeno, ya sea por síntesis defectuosa<sup>122, 197</sup> o por patologías que modifican la estructura de la proteína en circulación<sup>201</sup>. El

contenido hidrocarbonado del Fbg modificó las redes de fibrina y permitió relacionar las alteraciones vinculadas a sus distintas propiedades: el descenso de rigidez ( $< G'$ ) fue asociado mediante estudios reométricos a la presencia de muchas fibras curvadas en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Estos conocimientos nos permiten, en parte, interpretar nuestros resultados. El agregado de Hcy *in vitro* no puede aumentar la concentración de fibrinógeno, pero podría modificar su constitución, causando una polimerización diferente del control. Además, la Hcy podría modificar las redes de fibrina, permitiendo asociar el aumento de rigidez ( $> G'$ ) por estudios reométricos con la presencia de fibras más cortas, tensas y rectas (menos curvadas) en el análisis por microscopía electrónica<sup>197</sup>.

Otro de los factores que influyen drásticamente en las propiedades reológicas de la fibrina es el entrecruzamiento covalente de las fibras inducido por el FXIII. Se ha reportado que coágulos entrecruzados exhiben dureza mecánica (representada por  $G'$ ) 5 veces mayor que los no entrecruzados<sup>102, 107</sup>. El aumento de rigidez en coágulos entrecruzados ha sido atribuido a la formación de polímeros de la cadena  $\alpha$  más que de la cadena  $\gamma$ <sup>104, 106, 107, 201</sup>. En base a estos reportes y a los resultados precedentes se sugiere que la Hcy podría aumentar la actividad biológica de FXIII, generando mayor entrecruzamiento.

***Por ensayos de reometría se verificaron cambios en la consistencia de geles de fibrina obtenidos en presencia de Hcy, detectados por el aumento de  $G'$ ,  $G''$  y del % de deformación que son capaces de soportar estos geles sin que se altere su estructura.***

***Se concluye que los geles de fibrina obtenidos en presencia de Hcy tienen el componente fluido más viscoso y compartimentalizado dentro de una estructura sólida más entrecruzada, dando lugar a un gel más rígido y menos deformable.***

## COMPACTACIÓN

Los datos de microscopía electrónica, apoyados por los de permeabilidad, reometría y cinética de fibrinoformación, sostienen que las redes de fibrina que se forma en presencia de Hcy son más densas, entrecruzadas, sólidas y con mayor compartimentalización del componente viscoso que el correspondiente control. Por lo tanto, es de esperar que estas redes se compacten menos, liberando menor cantidad de líquido ante el mismo efecto deformante.

### *Compactación de Fibrina Plasmática.*

Se realizaron ensayos de compactación utilizando geles de fibrina de plasmas preincubados con agregado de diferentes concentraciones de Hcy (c.f. = 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ), los que fueron obtenidos por coagulación con Trb (c.f. = 0,05 U/ml) y Ca (c.f. = 33 mM). Luego de 2 horas de estabilización, fueron sometidos a centrifugación suave (300 x g) durante 2 minutos. Se determinó el peso del líquido exudado, mediante una balanza analítica. Se realizaron 3 ensayos diferentes, por triplicado. Los resultados se expresan como % del peso del líquido exudado respecto al peso total del gel.

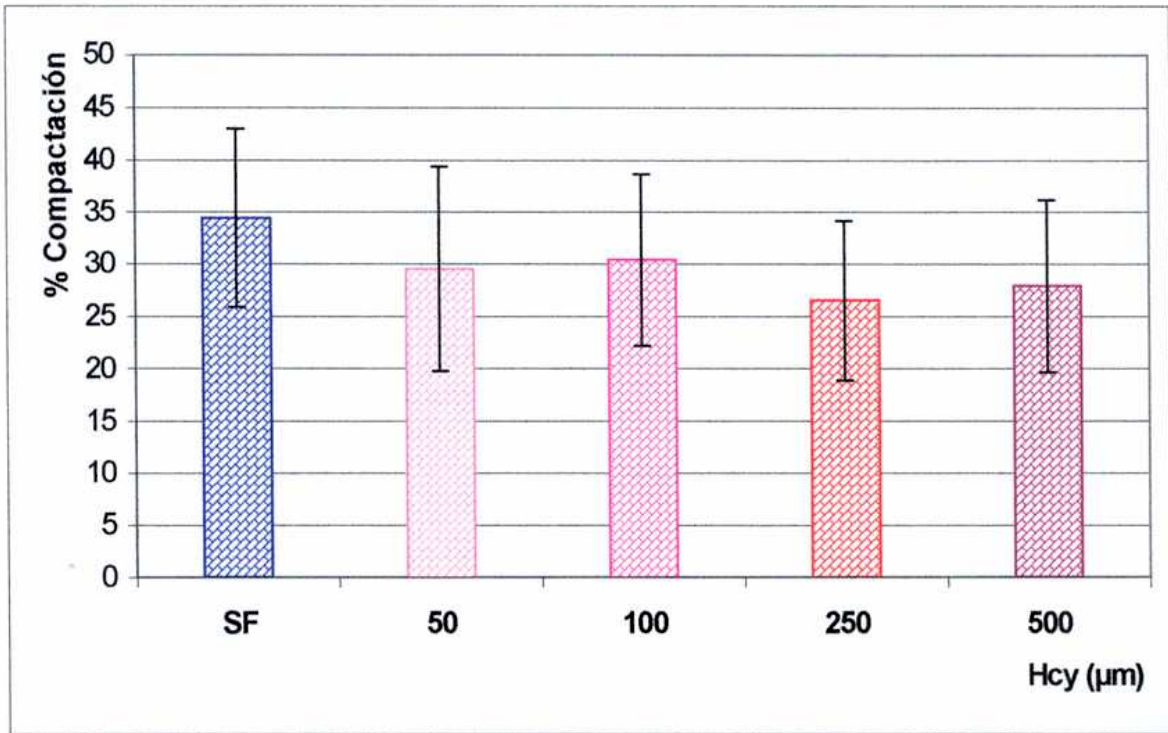
**Tabla 22:** Compactación de fibrina plasmática obtenida en presencia de Hcy.

	% Compactación	<i>p</i>
Control (SF)	34,40 $\pm$ 8,53	
Hcy 50 $\mu\text{M}$	29,55 $\pm$ 9,79	NS
Hcy 100 $\mu\text{M}$	30,39 $\pm$ 8,23	NS
Hcy 250 $\mu\text{M}$	26,50 $\pm$ 7,69	NS
Hcy 500 $\mu\text{M}$	27,90 $\pm$ 8,29	NS

Resultados expresados como *promedio  $\pm$  desvío estándar*.  
La comparación estadística se realizó con el test de Mann-Whitney.

NS: diferencias no significativas.





**Figura 51:** Ensayo de compactación a partir de geles de plasmas preincubados con diferentes concentraciones de Hcy.

Si bien se observa un descenso del porcentaje de compactación en los geles que contienen Hcy, los resultados estadísticos no mostraron diferencias significativas, lo que indicaría que las redes de fibrina plasmática, formadas en presencia de Hcy, se compactan de igual modo que las controles ante la misma fuerza centrífuga.

#### ***Compactación de Fibrina Obtenida a partir de Fibrinógeno Purificado.***

Se realizaron ensayos de compactación utilizando geles de fibrina obtenidos a partir de una solución de fibrinógeno purificado (c.f. = 3 g/l) preincubado con Hcy (c.f. = 500 µM) y coagulados con Trb (c.f. = 0,1U/ml) y Ca (c.f. = 33 mM). Los geles permanecieron dos horas a 37 °C para completar la fibrinoformación y fueron sometidos a centrifugación suave (300 x g) durante 2 minutos. Se determinó, por sextuplicado, el peso de la solución exudada mediante una balanza analítica. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar de los porcentajes de compactación de cada muestra.

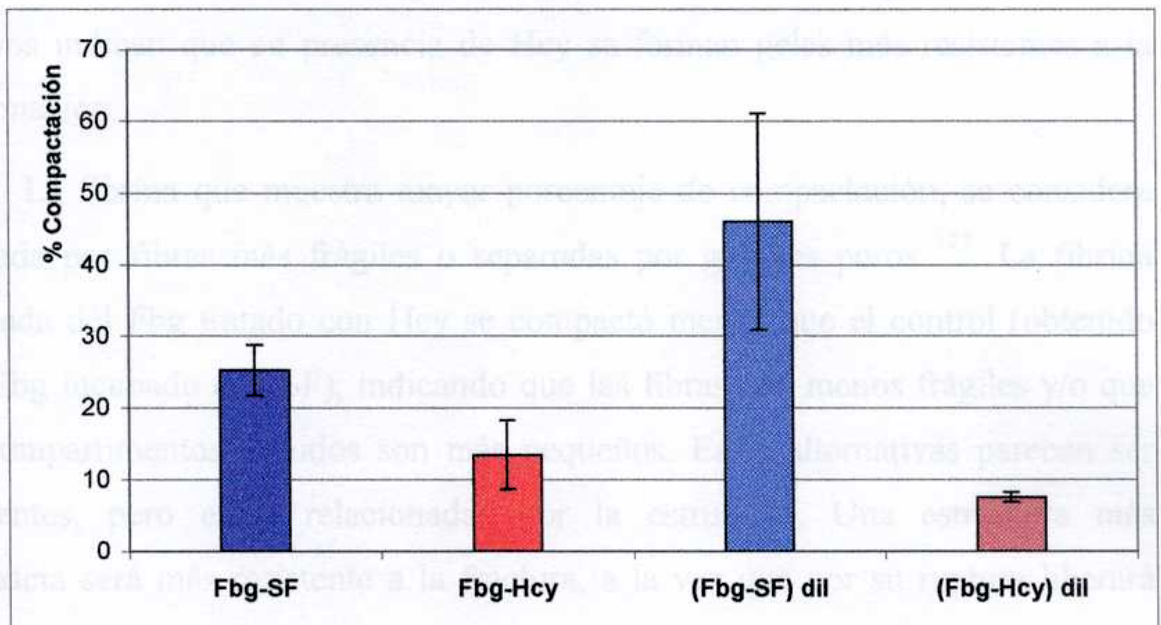
**Tabla 23:** Efecto de la Hcy sobre Ensayos de Compactación de fibrina obtenida a partir de Fbg purificado. A) [Fbg] = 3 g/l B) [Fbg] = 0,75 g/l

A)	% Compactación	
SF	22,24 ± 3,56	
Hcy	13,44 ± 4,77	$P < 0,05$

B)	% Compactación	
SF	45,99 ±	15,12
Hcy	7,55 ±	0,69 $P < 0,05$

Resultados expresados como *promedio ± desvío estándar*.

La comparación estadística se realizó con el test de Mann-Whitney.



**Figura 52:** Efecto de la Hcy (500  $\mu$ M) sobre la compactación de geles obtenidos a partir de soluciones de Fbg.

Como puede observarse, la Hcy produjo diferencias significativas en los ensayos de compactación de geles obtenidos a partir de Fbg purificado, en ambas condiciones utilizadas. Estos resultados indican que la Hcy produjo

modificaciones en el Fbg que se manifiestan por la formación de geles de fibrina menos compactables.

## DISCUSIÓN

No se ha reportado ningún trabajo que haya evaluado el efecto de la Hcy sobre la compactación de geles de fibrina. Este procedimiento es utilizado para evaluar las propiedades de fibrinas procedentes de fibrinógenos que presentan alteraciones moleculares, para ser vinculadas con trastornos hemorrágicos o trombóticos en los pacientes portadores.

La compactación de geles de fibrina provenientes de plasma tratado con Hcy mostró una leve disminución respecto a los controles, aunque las diferencias no fueron significativas. Estos datos tienen ciertas coincidencias con los resultados reométricos. Si bien los datos reométricos evalúan la respuesta de la fibrina a fuerzas tangenciales, mientras que la compactación evalúa la respuesta de la fibrina a fuerzas centrífugas (perpendiculares a las tangenciales), ambos ensayos indican que en presencia de Hcy se forman geles más resistentes a la deformación.

La fibrina que muestra mayor porcentaje de compactación, se considera formada por fibras más frágiles o separadas por grandes poros<sup>123</sup>. La fibrina derivada del Fbg tratado con Hcy se compactó menos que el control (obtenido con Fbg incubado con SF), indicando que las fibras son menos frágiles y/o que los compartimentos líquidos son más pequeños. Estas alternativas parecen ser diferentes, pero están relacionadas por la estructura. Una estructura más compacta será más resistente a la fractura, a la vez que por su ruptura liberará menor cantidad de líquido.

La presencia de grupo tiol en la molécula de Hcy le confiere propiedades oxidantes o reductoras dependiendo del potencial de reducción del medio<sup>202</sup>. El Fbg tiene varios radicales capaces de ser oxidados y/o reducidos. Además, posee 4 grupos sulfhidrilo libres, que podrían formar enlaces disulfuro con la Hcy. Por lo tanto, es posible que la Hcy reaccione con el Fbg produciendo alteraciones en

la proteína que conduzcan a una fibrina más resistente a la compactación. Se ha publicado <sup>Dcomp3</sup> que la compactación de fibrina plasmática descendió linealmente con el período de tiempo que permaneció la muestra congelada a 20°C bajo cero. Efecto de almacenar el plasma congelado, el Fbg sufrió modificaciones que condujeron a un menor porcentaje de compactación de la fibrina, aunque las diferencias registradas no resultaron significativas. Los autores concluyeron que el almacenaje alteró la actividad de rehidratación del Fbg, modificando las características del gel de fibrina. La Hcy podrían provocar cambios en el Fbg que modifiquen la hidratación de la molécula y, en consecuencia, la constitución del gel de fibrina.

*Los ensayos de compactación indicaron que la Hcy produjo modificaciones en el Fbg, que se manifiestan por la formación de geles de fibrina más resistentes a la fractura por efecto de fuerzas externas y/o porque los compartimentos líquidos serían más pequeños. Se propone que la Hcy modificarían la hidratación de la molécula de fibrinógeno, y en consecuencia la constitución del del gel de fibrina.*

## PERMEABILIDAD

Uno de los aspectos que surge de las diferencias observadas en los resultados de microscopía electrónica y ensayos reométricos es que geles más compactos deberían ser menos permeables, impidiendo la difusión de componentes plasmáticos involucrados en la fibrinólisis.

Con el fin de avanzar en el esclarecimiento de los mecanismos que contribuyen a la acción protrombótica de la Hcy, se diseñó un sistema que permitiera medir con suficiente sensibilidad la permeabilidad de geles de fibrina plasmática y geles provenientes de compuestos purificados.

En primer lugar debe determinarse como se comporta el sistema vacío (sin los geles de fibrina y sin filtro en los terminales) y si éste influye en la medición de la permeabilidad de los geles plasmáticos.

Dentro de las columnas de acrílico se formaron geles de fibrina por acción de Trb (c.f. 0.05 U/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (c.f. 33 mM) sobre los plasmas preincubados con Hcy. Luego de una hora en reposo (para asegurar la gelificación completa y la acción del FXIII plasmático), se realizaron mediciones de permeabilidad utilizando SF como eluyente.

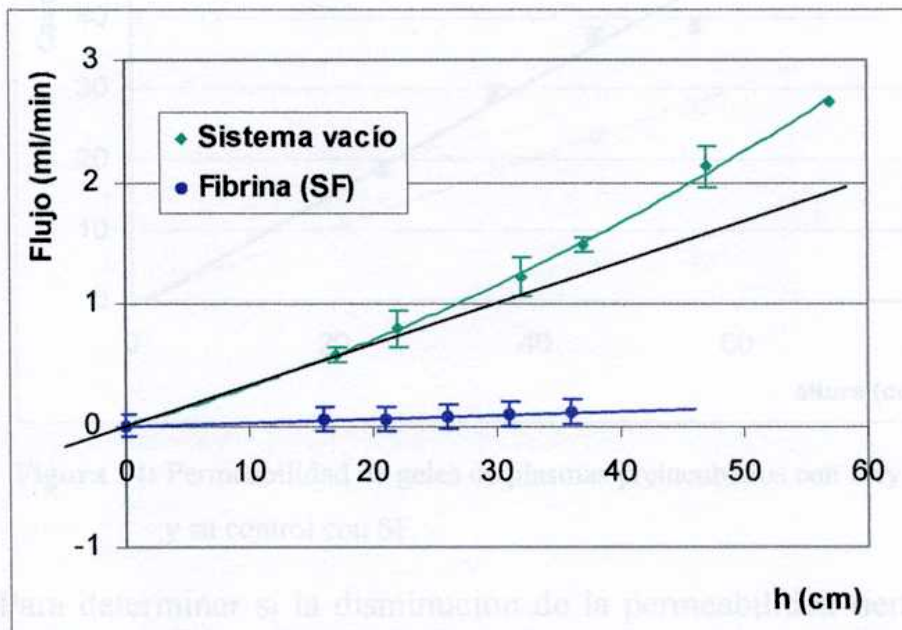
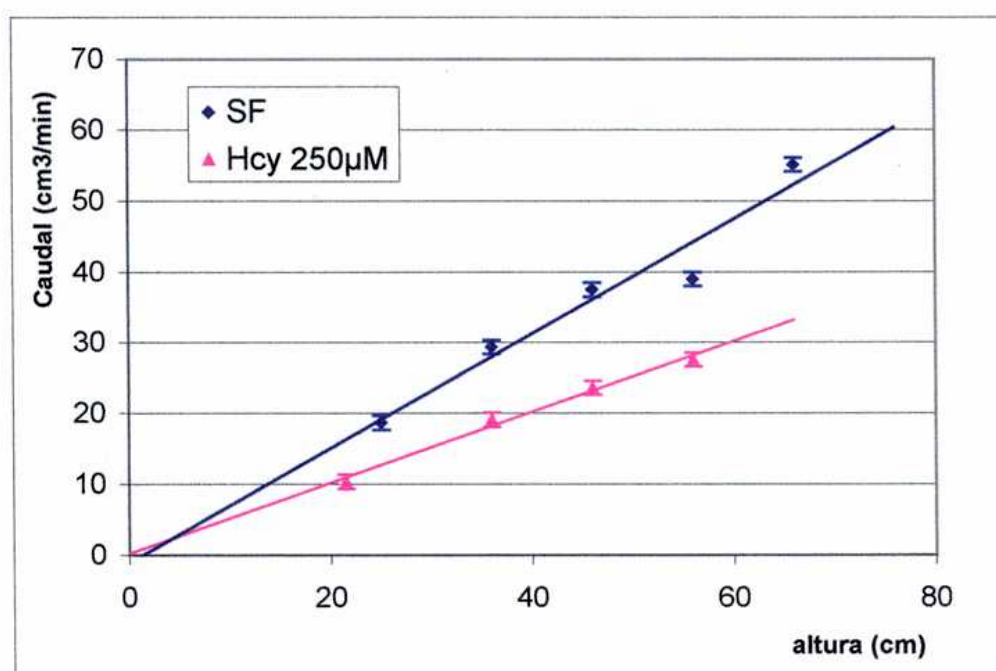


Figura 53: Permeabilidad de geles de fibrina respecto al sistema vacío.

El flujo medido con el sistema vacío (Figura 53) presenta una relación polinómica con respecto a la presión ejercida. A baja presión, el sistema ofrece una resistencia determinada por el pequeño calibre de las tubuladuras. Cuando la columna contiene geles de fibrina la relación entre el flujo y la presión es lineal, dependiendo de la permeabilidad del gel. Si aproximamos la función del sistema vacío a una recta, su pendiente difiere en más de un orden de magnitud de las obtenidas con geles de fibrina. Por lo tanto, no es necesario considerarla para relacionar fibrina obtenida en distintas condiciones.

### *Acción de la Hcy en la Permeabilidad de Geles de Fibrina Plasmática*

Cuando se comparó la permeabilidad de geles de fibrina de plasmas preincubados con Hcy 250  $\mu\text{M}$ , el flujo resultó inferior que el control a la misma presión ejercida, indicando que estos geles fueron menos permeables que el control.

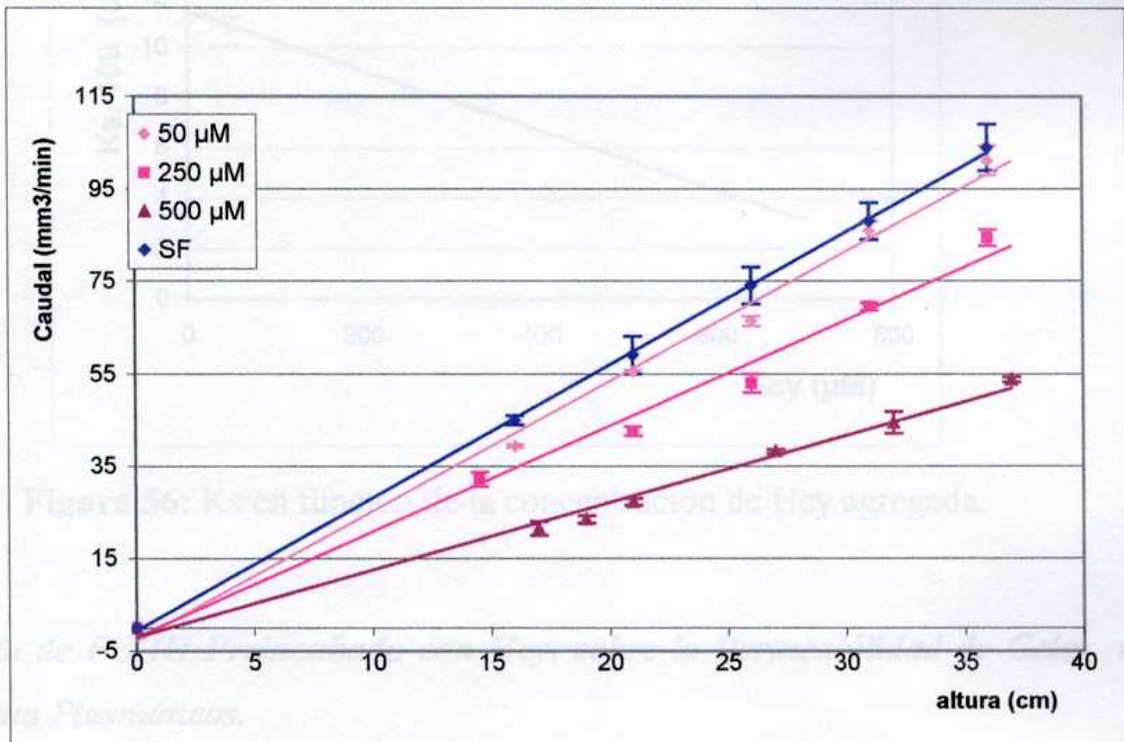


**Figura 54:** Permeabilidad de geles de plasmas preincubados con Hcy 250  $\mu\text{M}$  y su control con SF.

Para determinar si la disminución de la permeabilidad tiene una relación dosis dependiente con la concentración de Hcy utilizada, se realizaron incubaciones de pool plasmático con diferentes concentraciones de Hcy. Con

ellos se formaron columnas de fibrina y se determinó el flujo a distintas presiones.

En la Figura 55 puede observarse la disminución de la permeabilidad con el aumento de la concentración de Hcy agregada. A partir de estos datos, de la geometría de las columnas (sección=  $0,28 \text{ cm}^2$ ,  $L= 11,9 \text{ cm}$ ) y de la viscosidad del fluido ( $\eta = 10^{-2} \text{ Poise}$ ,  $\text{Poise} = \text{dyn.s.cm}^{-2}$ ), se calcularon los coeficientes de permeabilidad intrínseca ( $K_s$  o constante de Darcy) para cada una de las concentraciones de Hcy (Tabla 24). En la Figura 56 se observa la relación lineal entre los  $K_s$  y la concentración de Hcy agregada. Estos datos aseveran que la incubación de plasma con Hcy produce cambios en la formación de la fibrina que conducen a geles de menor permeabilidad.

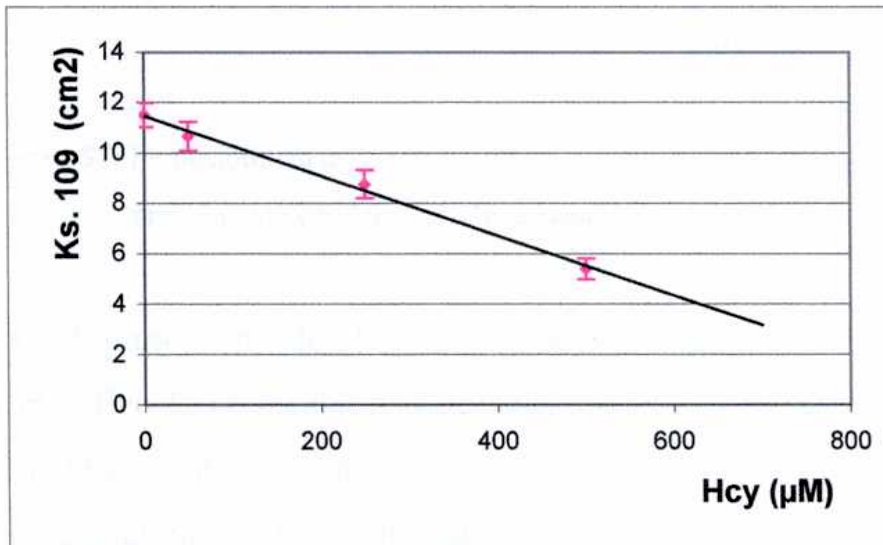


**Figura 55:** Permeabilidad de geles de plasmas preincubados con Hcy o SF.

**Tabla 24:** Valores de Ks de los geles de fibrina de plasmas preincubados con Hcy o SF.

	Ks ( $10^{-9}$ cm <sup>2</sup> )	p
<b>Control (SF)</b>	<b>11,52 ± 0,48</b>	
Hcy 50 μM	10,65 ± 0,58	< 0,01
Hcy 250 μM	8,75 ± 0,56	< 0,01
Hcy 500 μM	5,41 ± 0,41	< 0,01

media ± ds



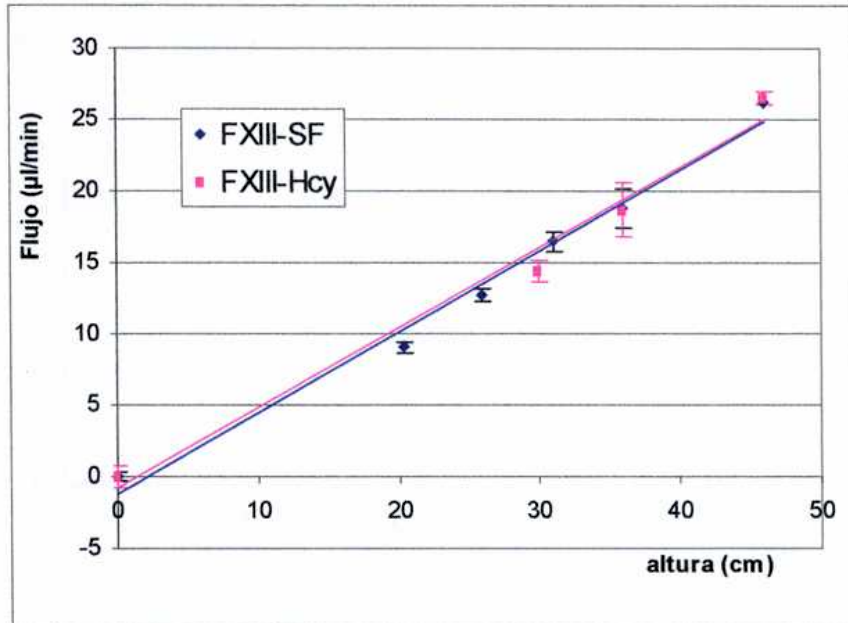
**Figura 56:** Ks en función de la concentración de Hcy agregada.

***Efecto de F XIII Preincubado con Hcy, sobre la Permeabilidad de Geles de Fibrina Plasmáticos.***

La presencia de Hcy disminuyó la permeabilidad de geles plasmáticos. Una hipótesis es que la Hcy afectaría al FXIII, de modo de generar fibras de fibrina más entrecruzadas. Con el objeto de comprobar esta hipótesis, se preincubó un concentrado de FXIII (10 U/ml) con Hcy (5 mM) y con SF como control. Se agregaron alícuotas de cada una de estas soluciones (cf F XIII



agregado 1U/ml) a plasma normal que fue coagulado con Trb-Ca (cf Trb =0,05 U/ml, cf Ca =33 mM).



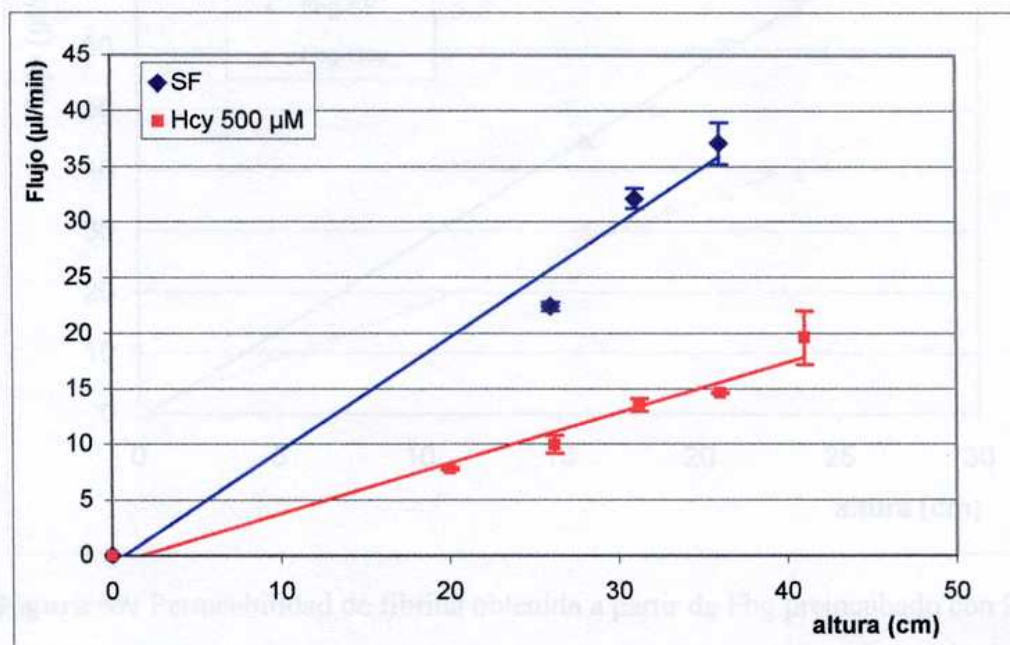
**Figura 57:** Permeabilidad de geles plasmáticos a los que se agregó FXIII preincubado con Hcy. [FXIII agregado] = 1U/ml, [Trb] = 0,05 U/ml.

En la Figura 57 puede observarse que la incubación de FXIII con Hcy (5 mM) no modificó la permeabilidad de geles de fibrina respecto al agregado de FXIII preincubado con SF. A pesar de que se agregó igual cantidad de FXIII que el aportado por el plasma (1 U/ml), este sistema no permitió detectar diferencias por el efecto de la Hcy.

### ***Geles de Fibrina Obtenidos a partir de Sustancias Puras.***

Con el objeto de simplificar el sistema y de identificar las sustancias involucradas en la modificación de la permeabilidad plasmática, se incubaron (1 hs, 37°C) alícuotas de una solución de fibrinógeno humano (3 g/l) y FXIII (1 U/ml), con una solución recién preparada de Hcy (Cf = 500 µM), utilizando solución fisiológica como control. Las soluciones se coagularon con Trb (0,1

U/ml) y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (33 mM) y se determinó el flujo en función de la diferencia de presión ejercida.

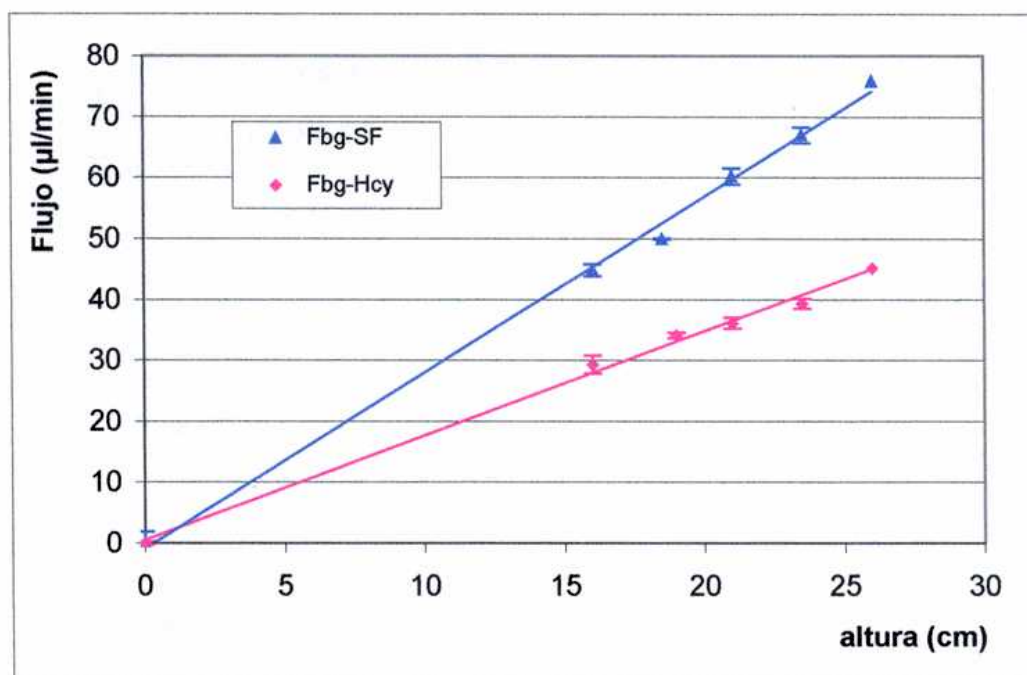


**Figura 58:** Efecto de la Hcy sobre la permeabilidad de (Fbg + FXIII)

En la Figura 58 puede verse que la permeabilidad de la fibrina obtenida a partir de un sistema purificado, preincubado con Hcy (500  $\mu\text{M}$ ) resultó significativamente inferior al control, preincubado con SF, corroborando que el Fbg y/o el FXIII fueron modificados.

Con el objeto de determinar cuál/es de los componentes utilizados fue afectado por acción de la Hcy, se incubaron separadamente cada uno de ellos con el aminoácido y posteriormente se eliminó la Hcy libre. Una solución de fibrinógeno (3 g/l) fue incubada con Hcy (500  $\mu\text{M}$ ), o SF como control y posteriormente dializadas. Se determinó la concentración proteica por el método de Bradford.

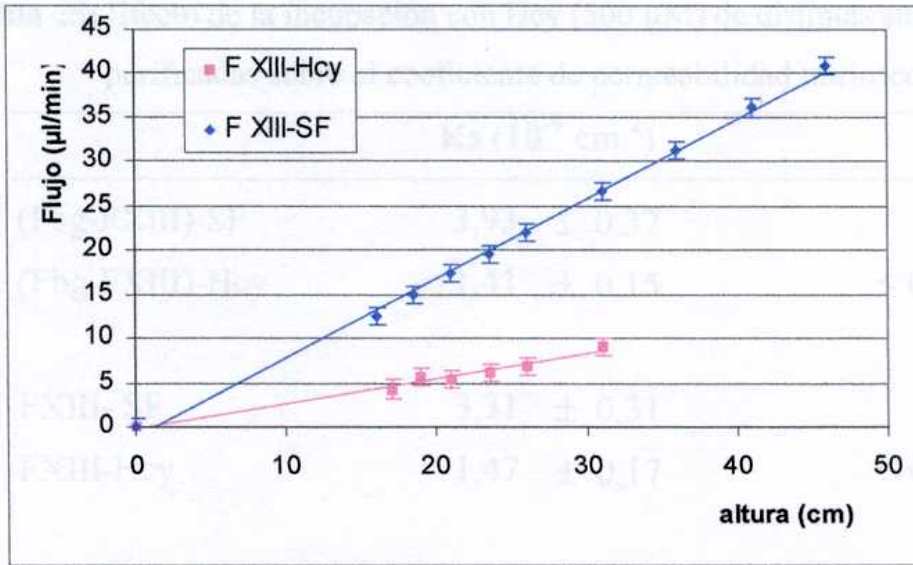
Las soluciones de fibrinógeno fueron respectivamente coaguladas en presencia de FXIII (0,5 U/ml) con una mezcla de Trb (0.1 U/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (33 mM) y se determinó el flujo en función de la presión.



**Figura 59:** Permeabilidad de fibrina obtenida a partir de Fbg preincubado con Hcy (Control: Fbg-SF).

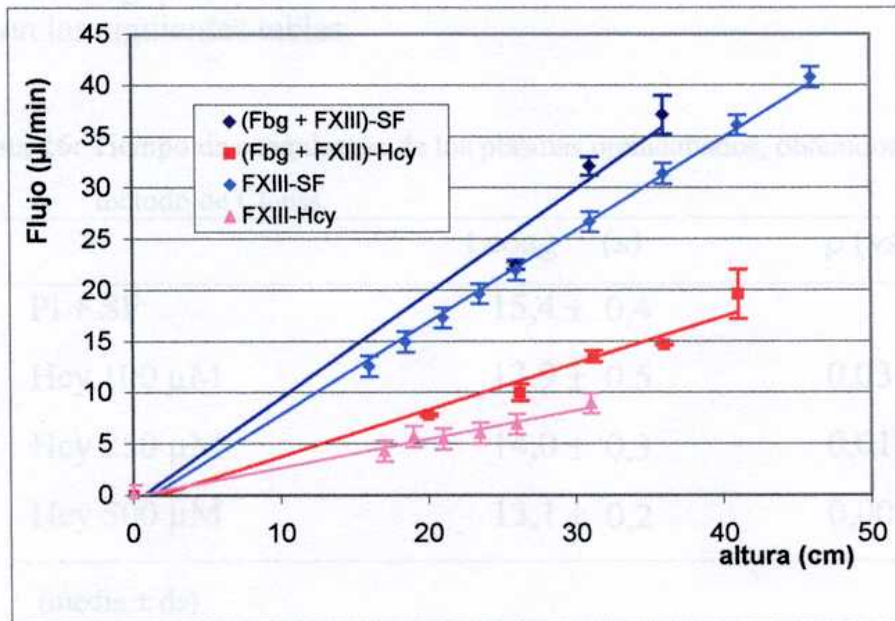
En la Figura 59 puede verse que la permeabilidad de fibrina obtenida a partir de fibrinógeno preincubado con Hcy resultó significativamente inferior al control. Los valores de Ks están presentados en la tabla 25. Su reducción indica que el Fbg es modificado por la Hcy, generando geles de fibrina menos permeables.

Se preincubaron (1 h a 37 °C) partes iguales de una solución de FXIII (10 U/ml) con Hcy (5 mM) o SF como control. Con el objetivo de separar la Hcy no unida al FXIII después de la incubación, ambas fracciones fueron centrifugadas a través de tubos Centricon. (El control recibió el mismo tratamiento). Se determinó la concentración proteica por el método de Lowry, en ambas soluciones resultantes. Se formaron columnas de fibrina a partir de una solución de Fbg (3 g/l) a la que se agregó separadamente alícuotas de FXIII preincubadas (c.f. 0,5 U/ml), Tb (0,1 U/ml) y CaCl<sub>2</sub> (33 mM). Se determinó la permeabilidad de sendas columnas de fibrina estabilizada.



**Figura 60:** Efecto de la Hcy sobre el FXIII.

En la Figura 60 se observa que la preincubación de FXIII con Hcy produjo geles de menor permeabilidad que el control. Estos datos apoyarían la hipótesis de que la Hcy genera cambios en la transglutaminasa, conduciendo a una fibrina menos permeable que el control.



**Figura 61:** Comparación de la permeabilidad de geles en distintos sistemas purificados.

En la Figura 61 y en la tabla XII pueden compararse los datos provenientes de fibrinas obtenidas por efecto de la Hcy sobre distintos componentes purificados.

**Tabla 25:** Efecto de la incubación con Hcy (500  $\mu\text{M}$ ) de distintas sustancias purificadas sobre el coeficiente de permeabilidad intrínseca (Ks).

	Ks ( $10^{-9} \text{ cm}^2$ )	p
(Fbg-FXIII)-SF	3,93 $\pm$ 0,37	
(Fbg-FXIII)-Hcy	1,41 $\pm$ 0,15	< 0,01
FXIII- SF	3,31 $\pm$ 0,31	
FXIII-Hcy	1,47 $\pm$ 0,17	< 0,01
Fbg-SF	11,40 $\pm$ 0,37	
Fbg-Hcy	7,07 $\pm$ 0,27	< 0,01

(media  $\pm$  ds)

**Efecto de la Hcy sobre Reacciones con Fibrinógeno Preincubado**

Con el objeto de detectar algún efecto de la Hcy sobre el Fbg, se utilizó el método de Clauss y el tiempo de *Reptilase*<sup>®</sup> con la mezcla de plasmas y soluciones de Fbg preincubados con el aminoácido o SF. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

**Tabla 26:** Tiempo de coagulación de los plasmas preincubados, obtenidos por el método de Clauss.

	t coag (s)	p (vs SF)
Pl + SF	15,4 $\pm$ 0,4	
Hcy 100 $\mu\text{M}$	13,9 $\pm$ 0,5	0,03
Hcy 250 $\mu\text{M}$	14,0 $\pm$ 0,3	0,01
Hcy 500 $\mu\text{M}$	13,1 $\pm$ 0,2	0,001

(media  $\pm$  ds)

Los tiempos de coagulación disminuyeron significativamente respecto al control con las distintas soluciones de Hcy utilizadas. A pesar de que aumentó la significación con la concentración del aminoácido, los distintos niveles de Hcy no mostraron diferencias significativas entre sí.

También se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas por efecto de la Hcy entre los tiempos de coagulación de la mezcla de Fbg+FXIII.

**Tabla 27:** Tiempo de coagulación de las mezclas de Fbg + FXIII preincubados, obtenidos por el método de Clauss.

	t coag (s)	p
Fbg+FXIII+SF	16,0 ± 0,2	
Fbg+FXIII+Hcy 500 µM	22,3 ± 0,4	0,003

(media ± ds)

**Tiempo de Reptilase® (TR)**

Se mide el tiempo que demora en aparecer el coágulo de fibrina en presencia de una cantidad determinada del extracto de *Bothrops atrox* (*Reptilase®*), a partir de plasma o soluciones de fibrinógeno. Esta enzima corta exclusivamente la cadena A $\alpha$ , mientras la trombina corta las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$ .

Los tiempos de *Reptilase®* obtenidos con muestras preincubadas con Hcy resultaron iguales que los control, sugiriendo que la cadena A $\alpha$  del Fbg resultó inalterada.

**Tabla 28:** Tiempo de *Reptilase®* obtenidos con los plasmas preincubados.

	T.Reptilase (s)	p
Pl + SF	22,0 ± 1,6	
Hcy 100 µM	22,3 ± 1,0	NS
Hcy 250 µM	21,4 ± 1,0	NS
Hcy 500 µM	21,5 ± 0,5	NS

(media ± ds)

**Tabla 29:** Tiempo de *Reptilase®* de las mezclas de Fbg + FXIII preincubados con Hcy o SF.

	T.Reptilase® (s)	p
Fbg+FXIII+SF	27,6 ± 0,6	
dem+Hcy500	27,7 ± 1,0	NS

(media ± ds)

## DISCUSIÓN

La permeabilidad es una de las propiedades de la fibrina más estudiada. Ha permitido estimar cuantitativamente aquellos factores y proteínas que intervienen en las características de coágulos plasmáticos y de sustancias puras.

En esta sección se evaluó el efecto de la Hcy sobre la permeabilidad de geles de fibrina. Los coágulos obtenidos a partir de plasmas preincubados con soluciones de Hcy presentaron menor permeabilidad al aumentar la concentración del aminoácido (Figura 55). Hasta el momento, no se ha reportado ningún trabajo que haya evaluado este efecto, pero existen numerosos reportes bibliográficos que posibilitan comparar el análisis de los resultados así como valores de los parámetros obtenidos. Los niveles de Ks de los geles plasmáticos utilizados como referencia en el presente estudio son similares a los reportados en la literatura<sup>125, 170, 197</sup>.

La relación inversamente proporcional altamente significativa entre la concentración de Hcy y la permeabilidad de los geles obtenidos a partir de plasma, planteó la necesidad de investigar qué componentes involucrados en la fibrinoformación podrían afectarse por el aminoácido, causando los cambios en la permeabilidad de la fibrina resultante.

Con este objetivo se realizaron ensayos con geles de fibrina formados a partir de sustancias purificadas, en particular con Fbg y FXIII.

La figura 58, muestra el descenso de la permeabilidad de geles obtenidos luego de la incubación de (Fibrinógeno + FXIII). Estos resultados sugieren que la Hcy afectaría al Fbg y/o al FXIII. Por lo tanto, se procedió a evaluar separadamente la acción del aminoácido sobre cada uno de esos componentes.

La figura 59 muestra que el Fbg es modificado por la Hcy originando geles de menor permeabilidad; además, dicha modificación no revierte después de eliminar al aminoácido del medio de reacción. Se han publicado numerosos trabajos que evaluaron la permeabilidad de la fibrina por efecto de variaciones en

el Fbg. Blombäck B. ha demostrado que el fibrinógeno es uno de los principales factores involucrados en las propiedades de geles de fibrina *ex vivo* en salud y enfermedad. Ha reportado <sup>110</sup> la obtención de redes de fibrina más apretadas, formadas por cadenas cortas y de permeabilidad disminuida como consecuencia de aumentar la concentración de fibrinógeno. El mismo grupo ha propuesto recientemente <sup>204</sup>, un método sencillo y reproducible, que permite evaluar la permeabilidad de geles de fibrina plasmática, con el fin de detectar alteraciones patológicas o efectos farmacológicos.

Las moléculas de agua se unen por puentes de hidrógeno alrededor de la red de fibrina, formando el gel. Por lo tanto, la estructura y cargas electrostáticas de la red de fibrina determinan la permeabilidad del gel. Integrando estos conceptos con los resultados obtenidos, surge que la Hcy podría alterar algunos grupos funcionales del Fbg, y por consiguiente las cargas electrostáticas de la molécula, originando redes de fibrina de distinta estructura y/o distribución diferente de la moléculas de agua, generando un gel menos permeable.

Otros ensayos realizados sobre muestras plasmáticas apoyan la hipótesis de que la Hcy afectaría al Fbg. Cuando se determinaron los tiempos de coagulación de plasmas preincubados con Hcy obtenidos por el método de Clauss, se observó una disminución significativa respecto al control, independientemente de la concentración utilizada. En cambio, los tiempos de *Reptilase*® obtenidos con muestras preincubadas con Hcy resultaron iguales que los controles. Estos datos parecen indicar que la Hcy produciría cambios sobre la cadena B $\beta$  del Fbg, favoreciendo el proceso de gelificación ya descrito. Otros autores <sup>172</sup> también postularon alteraciones de la funcionalidad del Fbg mediadas por la Hcy, reportando una respuesta alterada de la polimerización de Fbg con calcio y del tiempo de coagulación con *Reptilase*® prolongado.

En la figura 60 se observa que el FXIII tratado con Hcy produce geles de fibrina menos permeables, indicando que también este componente fue modificado irreversiblemente por efecto del aminoácido. Resultados previos de nuestro laboratorio, basados en ensayos de solubilidad con urea, indicaron que la



Hcy afectaría la actividad del FXIII<sub>a</sub>, incrementando el entrecruzamiento de los monómeros de fibrina<sup>14</sup>. Se ha reportado<sup>99</sup> que sustancias con grupos tioles en la molécula incrementan el grado de entrecruzamiento del fibrinógeno y fibrina, mediado por el FXIII y que la permeabilidad de geles de fibrina disminuye a mayor concentración de FXIII, ya que se genera una estructura más cerrada. Por lo tanto, la Hcy también podría alterar la actividad enzimática de la transglutaminasa.

Existen otros componentes plasmáticos, tales como la fibronectina, que modulan la estructura de la fibrina. Se ha publicado que la incorporación de fibronectina preincubada con Hcy, a plasma normal, generó geles de fibrina más turbios y menos permeables, constituidos por fibras más anchas<sup>121</sup>. Estas características resultaron similares a las de los geles evaluados en la presente tesis. Por lo tanto, si bien no se realizaron experiencias con fibronectina y Hcy, no debería descartarse que el aminoácido también podría favorecer la unión de la fibronectina plasmática a la fibrina.

***Concluimos que la permeabilidad de geles de fibrina plasmática disminuyó al aumentar la concentración de Hcy.***

***La Hcy generó cambios en el Fbg (posiblemente sobre la cadena Bβ) y el F XIII, responsables del descenso de permeabilidad de la fibrina.***

***La permeabilidad disminuida dificultaría la difusión de componentes plasmáticos involucrados en la fibrinólisis.***

## SISTEMA PLASMINÓGENO-PLASMINA

Las redes de fibrina formadas en presencia de Hcy mostraron cambios en varias de sus propiedades (ME, reométricas, permeabilidad) sugiriendo que serían más resistentes a la lisis. Además, el aminoácido podría afectar la actividad biológica de los componentes del sistema plasminogeno-plasmina, modificando la actividad fibrinolítica. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se desarrollaron estudios cinéticos que permitieron estudiar el efecto de la Hcy sobre:

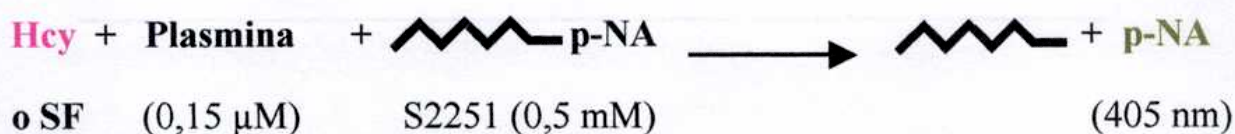
- **la actividad del sistema plasminógeno-plasmina**, evaluando
  - la actividad amidolítica de la plasmina y
  - la activación del plasminógeno.
- **la lisis de redes de fibrina**, estudiando
  - la lisabilidad de la fibrina obtenida en presencia de Hcy.
  - la lisis de redes estándar de fibrina.

### ACTIVIDAD DEL SISTEMA PLASMINÓGENO-PLASMINA

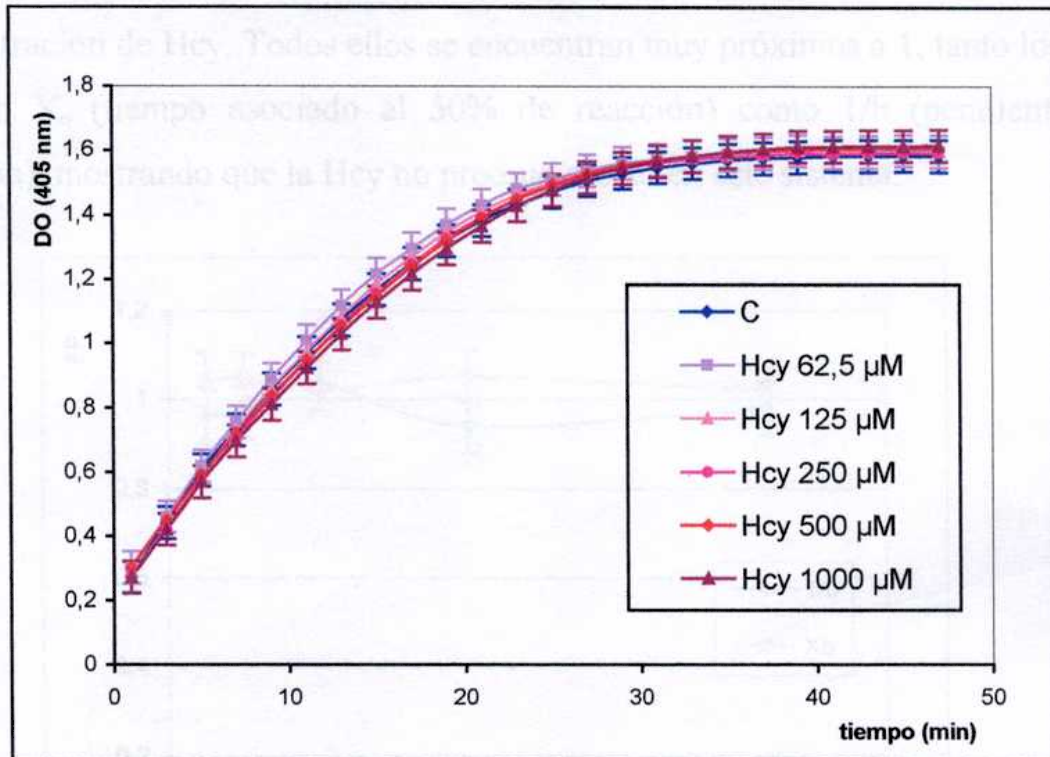
Para estudiar la acción de la Hcy sobre la actividad de los componentes del sistema fibrinolítico, se utilizó un método cinético para evaluar el efecto dosis-respuesta a distintas concentraciones de Hcy sobre la actividad amidolítica de plasmina y la activación del Plg.

#### *Estudio de la Acción de Hcy sobre la Actividad Amidolítica de Plasmina*

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) sobre la acción amidolítica de Plm, frente al sustrato cromogénico específico S-2251, en solución reguladora Tris 50 mM pH 7,5 determinando la liberación de p-NA (a 405 nm) en función del tiempo, utilizando un lector de ELISA. Cada ensayo fue realizado por triplicado.



Las curvas resultantes se graficaron en la Figura 62 y sus parámetros están presentados en la Tabla 30.

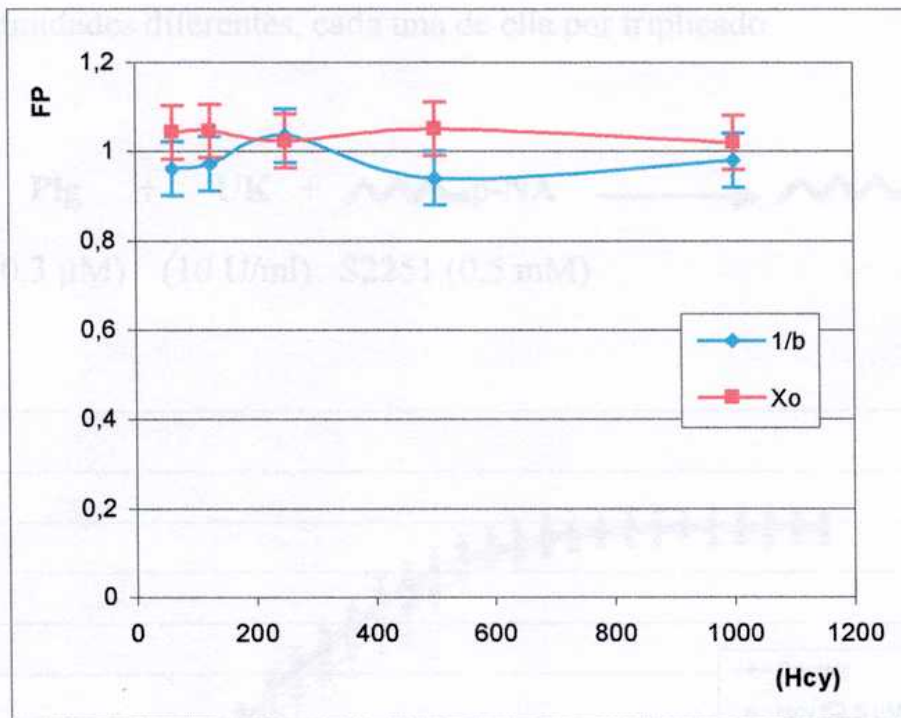


**Figura 62:** Acción de la Hcy sobre la actividad amidolítica de plasmina.

**Tabla 30:** Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica de plasmina a distintas concentraciones de Hcy.

	Pendiente ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{DO}_{\text{max}}$
SF	$0,064 \pm 0,005$	$1,58 \pm 0,02$
Hcy 63 $\mu\text{M}$	$0,065 \pm 0,003$	$1,60 \pm 0,01$
Hcy 125 $\mu\text{M}$	$0,065 \pm 0,004$	$1,59 \pm 0,02$
Hcy 250 $\mu\text{M}$	$0,063 \pm 0,003$	$1,59 \pm 0,01$
Hcy 500 $\mu\text{M}$	$0,061 \pm 0,005$	$1,59 \pm 0,02$
Hcy 1.000 $\mu\text{M}$	$0,061 \pm 0,004$	$1,61 \pm 0,02$

Como puede verse en la Figuras 62, la Hcy ensayada en un amplio rango de concentraciones (62,5; 125; 250; 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ), no modificó la actividad amidolítica de plasmina. En la Figura 63 se relacionaron los factores de potenciación de la actividad de plasmina obtenidos en función de la concentración de Hcy. Todos ellos se encuentran muy próximos a 1, tanto los que evalúan  $X_0$  (tiempo asociado al 50% de reacción) como  $1/b$  (pendiente de reacción), mostrando que la Hcy no produjo efecto en este sistema.

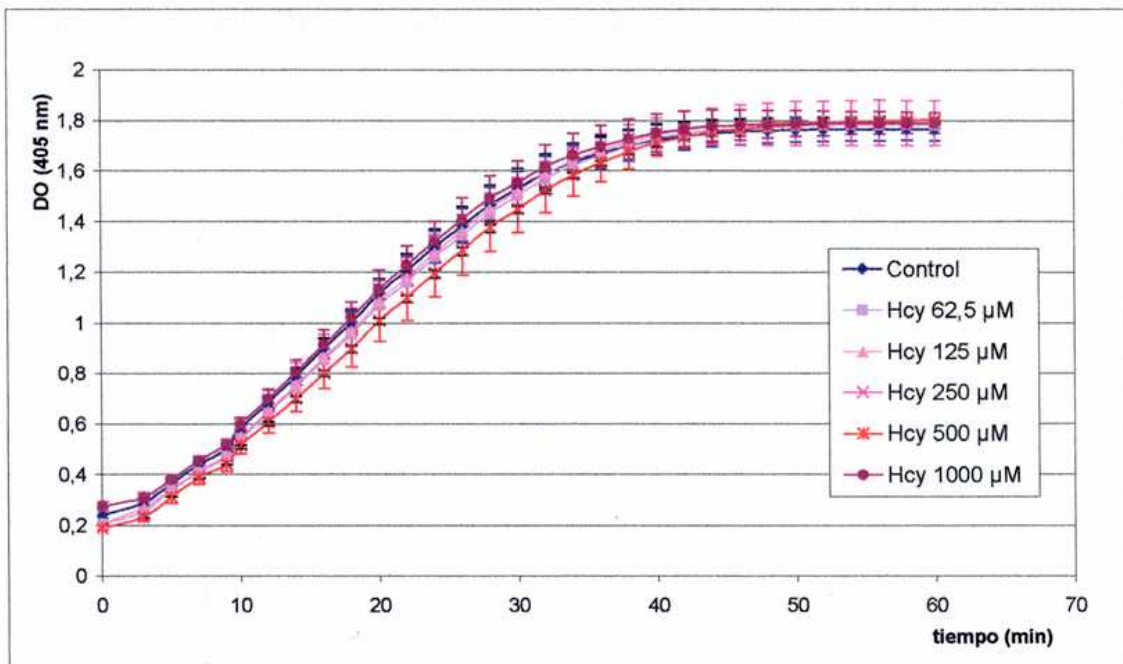
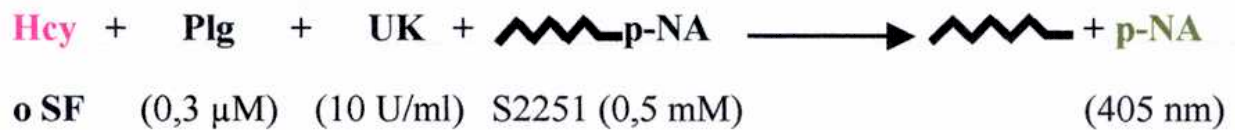


**Figura 63:** Factores de potenciación de la actividad de plasmina a diferentes concentraciones de Hcy.  **$1/b$** : pendiente de la curva y  **$X_0$** : tiempo correspondiente al 50% de reacción.

Por otro lado, se incubó plasmina con Hcy en las concentraciones del ensayo precedente (1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ ) y se ensayó posteriormente su actividad amidolítica en las mismas condiciones experimentales. Los resultados indicaron que la plasmina preincubada con distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ), no mostró variaciones en su actividad amidolítica.

### Acción de la Hcy sobre la Activación de Plasminógeno con Uroquinasa

Se evaluó la acción de distintas concentraciones de Hcy (4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre Plg (c.f. = 0,3  $\mu\text{M}$ ) activado por UK (c.f. = 10 U/ml) mediante el uso de un método cinético, evaluando la acción amidolítica de la plasmina generada sobre el sustrato cromogénico específico S-2251 (c.f. = 0,5 mM), en solución reguladora Tris 50 mM pH 7,5. Cada ensayo fue realizado en tres oportunidades diferentes, cada una de ella por triplicado.

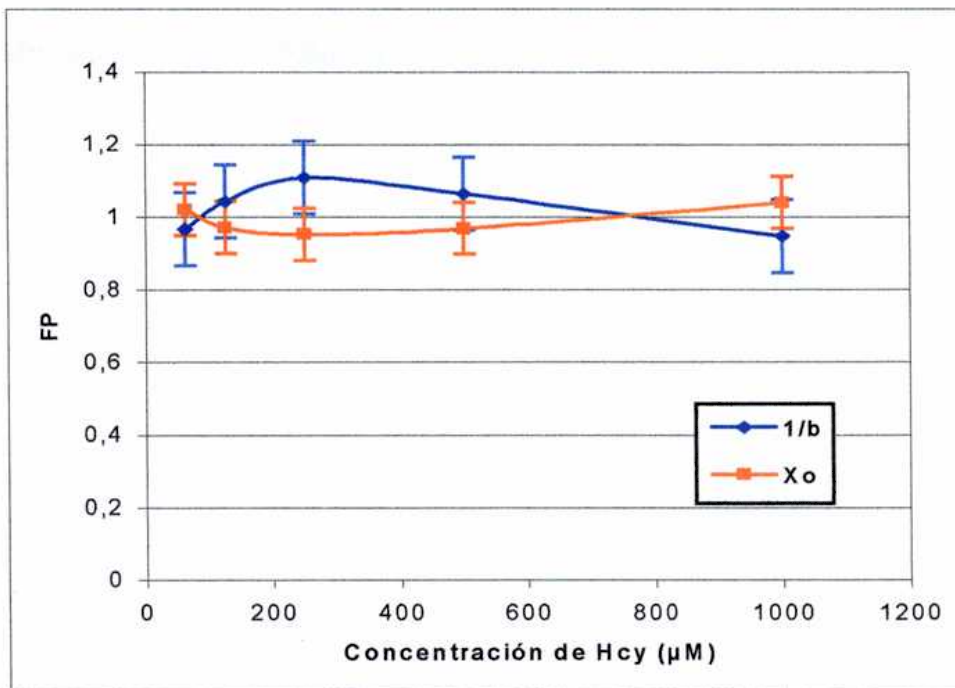


**Figura 64:** Efecto de Hcy sobre la activación de plasminógeno por uroquinasa y la actividad de plasmina.

**Tabla 31:** Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica de plasmina a distintas concentraciones de Hcy.

	Fase Lag (min)	Pendiente ( $\text{min}^{-1}$ )	$\text{DO}_{\text{max}}$
PBS	$7,1 \pm 0,2$	$0,046 \pm 0,007$	$1,827 \pm 0,02$
Hcy 63 $\mu\text{M}$	$6,9 \pm 0,5$	$0,049 \pm 0,001$	$1,820 \pm 0,03$
Hcy 125 $\mu\text{M}$	$7,0 \pm 0,3$	$0,049 \pm 0,002$	$1,796 \pm 0,05$
Hcy 250 $\mu\text{M}$	$7,2 \pm 0,2$	$0,046 \pm 0,004$	$1,799 \pm 0,04$
Hcy 500 $\mu\text{M}$	$7,0 \pm 0,4$	$0,046 \pm 0,002$	$1,790 \pm 0,03$
Hcy 1.000 $\mu\text{M}$	$6,9 \pm 0,3$	$0,046 \pm 0,002$	$1,801 \pm 0,04$

Se calcularon los factores de potenciación  $\text{FP}_{\text{Xo}}$  y  $\text{FP}_{1/b}$  para cada una de las concentraciones de Hcy, que están presentados en la Figura 65.



**Figura 65:** Factores de potenciación para  $\text{Xo}$  y  $1/b$  sobre la activación de Plg por u-PA, a diferentes concentraciones de Hcy.

Se incubó Plg con Hcy en las concentraciones del ensayo precedente (1 h a 37 °C) y se realizó el ensayo cromogénico, en las mismas condiciones experimentales. Los resultados indicaron que el Plg preincubado con distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ), no mostró variaciones en la cinética de reacción. En este ensayo se estudia simultáneamente la activación de Plg y la actividad de Plm. Como la actividad de plasmina no se vio modificada por la Hcy, podemos decir que la Hcy tampoco modifica la activación de plasminógeno en estas condiciones experimentales.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos líticos de fibrina testigo (formada en ausencia de Hcy), utilizando u-PA preincubada con Hcy, lo que indicaría que la actividad de los principales componentes del sistema fibrinolítico no se ve afectada por la Hcy.

***La Hcy no modificó la actividad biológica de plasmina, Plg y u-PA estudiadas por métodos amidolíticos.***



Figura 66: A

## LISIS DE FIBRINA

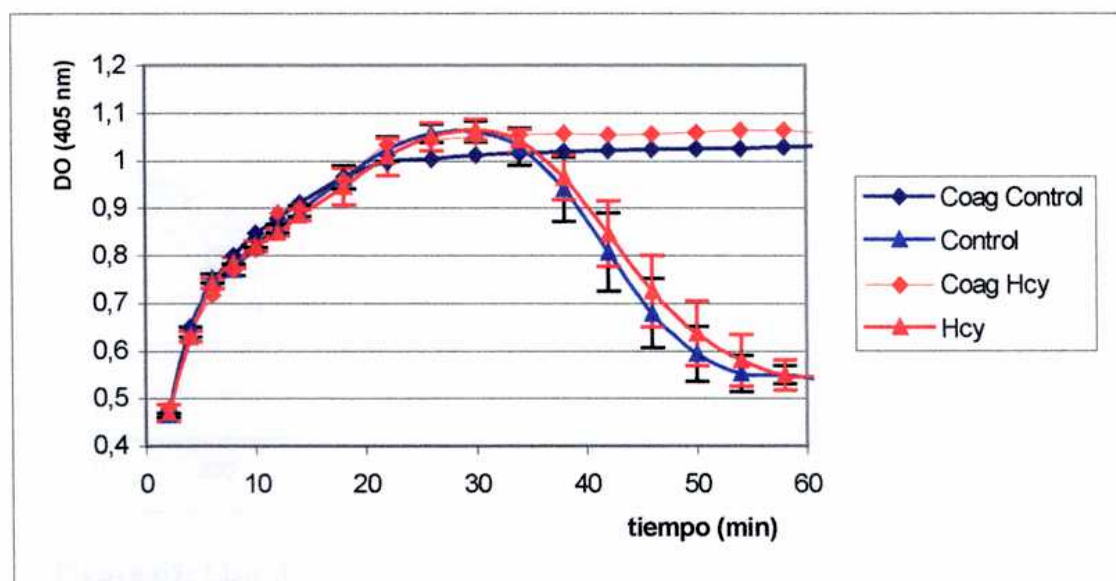
Para evaluar la lisis se utilizaron dos sistemas diferentes: uno de ellos se realizó en una sola etapa, donde la Hcy estuvo presente durante la formación y lisis de la fibrina en su conjunto. El otro, se realizó en dos etapas, separando ambos procesos.

### *Evaluación de la Coagulación y Fibrinolisis en una Etapa.*

Al sistema ya descrito para el estudio de la fibrinoformación, se le agregó un activador de plasminógeno con el objeto de acelerar la formación de plasmina en el interior del coágulo y registrar la fibrinoformación y la lisis dentro de un período de tiempo razonable.

### *Efecto de la Hcy sobre la Formación y Lisis de Redes de Fibrina en una Etapa.*

Alícuotas de una mezcla de plasmas normales citratados se incubaron separadamente con soluciones frescas de homocisteína en SF, en una concentración final (c.f.) = 500  $\mu$ M. La muestra control se obtuvo reemplazando la solución de Hcy por SF; se registró la densidad óptica (DO) a 405 nm en función del tiempo. Cada curva corresponde al promedio de tres ensayos. Se realizaron controles de coagulación en ausencia del sistema lítico.



**Figura 66:** Acción de la Hcy sobre la formación y lisis de redes plasmáticas.



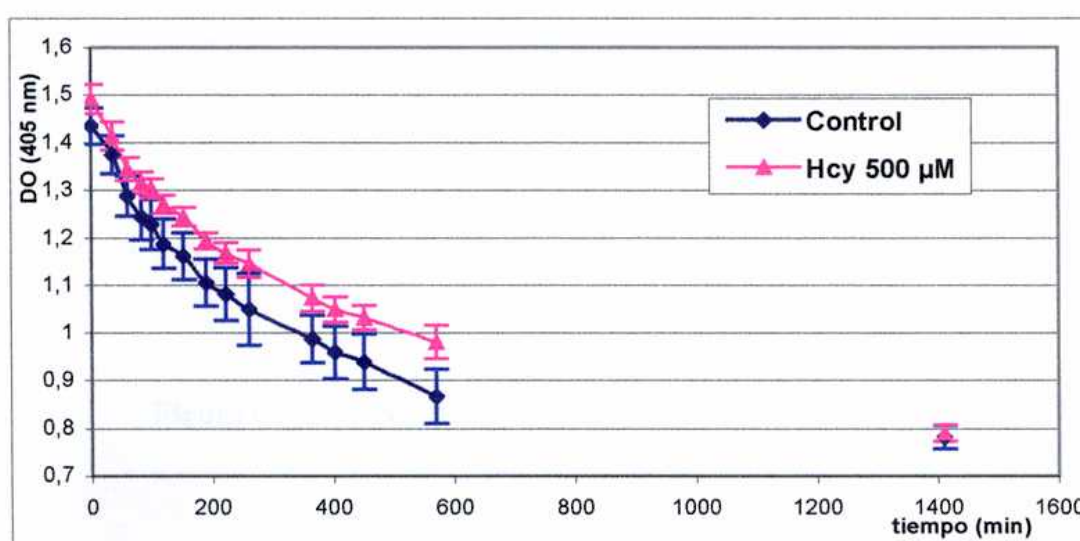
**Tabla 32:** Tiempos de lisis en el sistema en una etapa.

	t lisis (min)
Control	60 ± 3
Hcy	66 ± 5

En la figura se observa que ambas curvas son muy parecidas; el tiempo de lisis final de fibrina obtenida en presencia de Hcy es levemente mayor que el de los controles, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Se realizaron ensayos con menor cantidad de u-PA para extender los tiempos de lisis, pero los resultados no difirieron de los anteriores.

#### ***Lisis de redes formadas en presencia de Hcy con un sistema en dos etapas.***

Se formaron geles de fibrina plasmática según lo explicado en materiales y métodos, utilizando plasma incubado en presencia de distintas concentraciones de Hcy (c.f. = 500 y 100  $\mu\text{M}$ ) con Tb (c.f.: 0,25 UI/ml) y  $\text{CaCl}_2$  (c.f.: 33 mM). Una vez estabilizados los geles (1 h a 37°C) se agregó una solución de u-PA (25 UI/pocillo) o t-PA (10 UI/pocillo) en un volumen de 70  $\mu\text{l}$ . Se monitoreó la DO a 405 nm en función del tiempo.



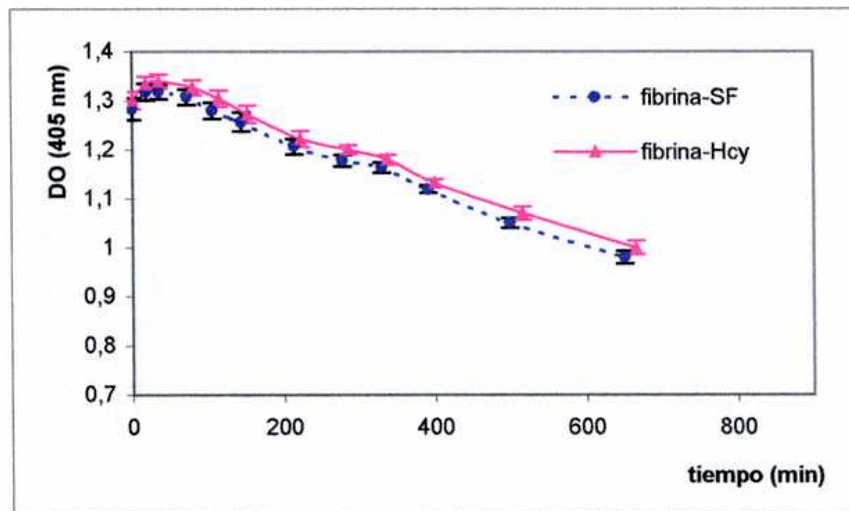
**Figura 67:** Lisis de fibrina formadas en presencia Hcy utilizando UK como activador de plasminógeno.

**Tabla 33:** Tiempos de lisis media de fibrina formado en presencia Hcy utilizando u-PA como activador de plasminógeno.

	t lisis (min)
Control	187 ± 6
Hcy	257 ± 36

Como se observa en la Figura 67, la fibrina obtenida en presencia de Hcy (500  $\mu$ M) se lisó más lentamente que la control cuando u-PA fue el activador de plasminógeno utilizado, resultando un tiempo de lisis media de  $257 \pm 36$  minutos respecto a  $187 \pm 6$  minutos. Estos resultados indican que la lisis de fibrina en presencia de Hcy está dificultada. Los tiempos de lisis de geles formados con Hcy 100  $\mu$ M resultaron semejantes a los de los controles.

Por otra parte, no se detectaron cambios cuando el activador de plasminógeno usado fue t-PA (Figura 68).



**Figura 68:** Lisis de redes obtenidas en presencia de Hcy utilizando t-PA como activador de Plg.

**Tabla 34:** Tiempos de lisis media de fibrina obtenida en presencia de Hcy utilizando t-PA

	t lisis (min)
Control	600 ± 30
Hcy	620 ± 25

**Efecto de Hcy sobre la lisis de redes plasmáticas iguales**

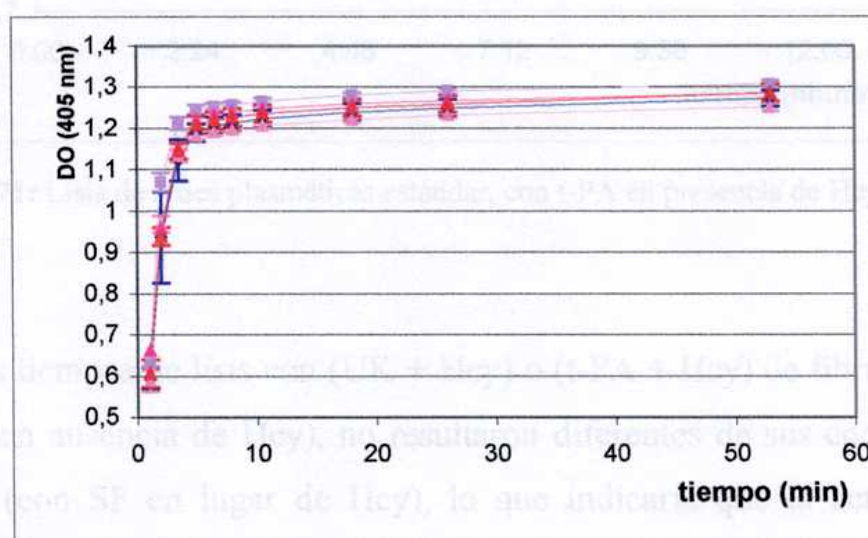
Se formaron redes de fibrina plasmática a partir de plasma (c.f. = 50 %), con trombina bovina (c.f. = 25 U/ml), y  $\text{CaCl}_2$  (c.f. = 33 mM), de manera que todas las redes formadas en esta experiencia fueron iguales. Sobre las redes estabilizadas se agregaron:

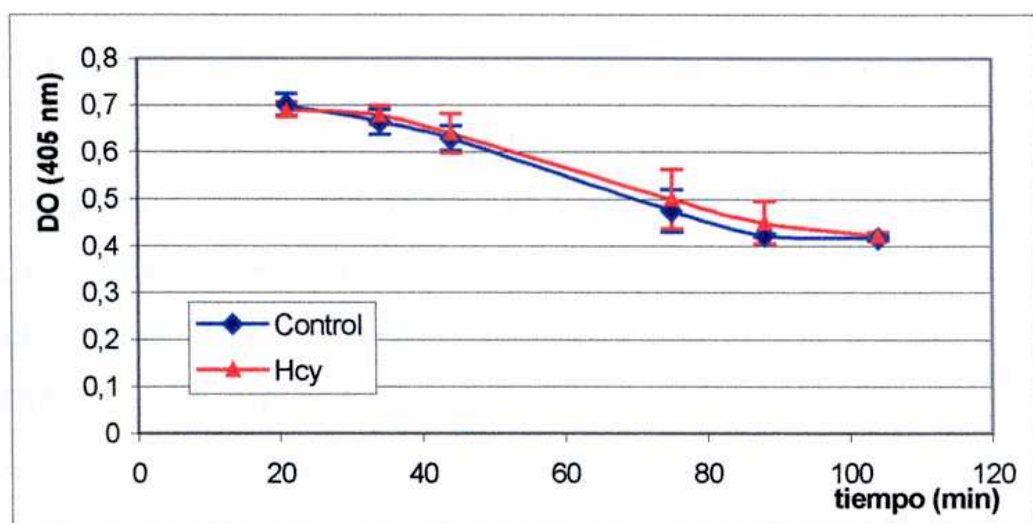
a) u-PA: (50 U/pocillo) + Hcy (c.f. = 500  $\mu\text{M}$ ).

Control: u-PA: (50 U/pocillo) + SF

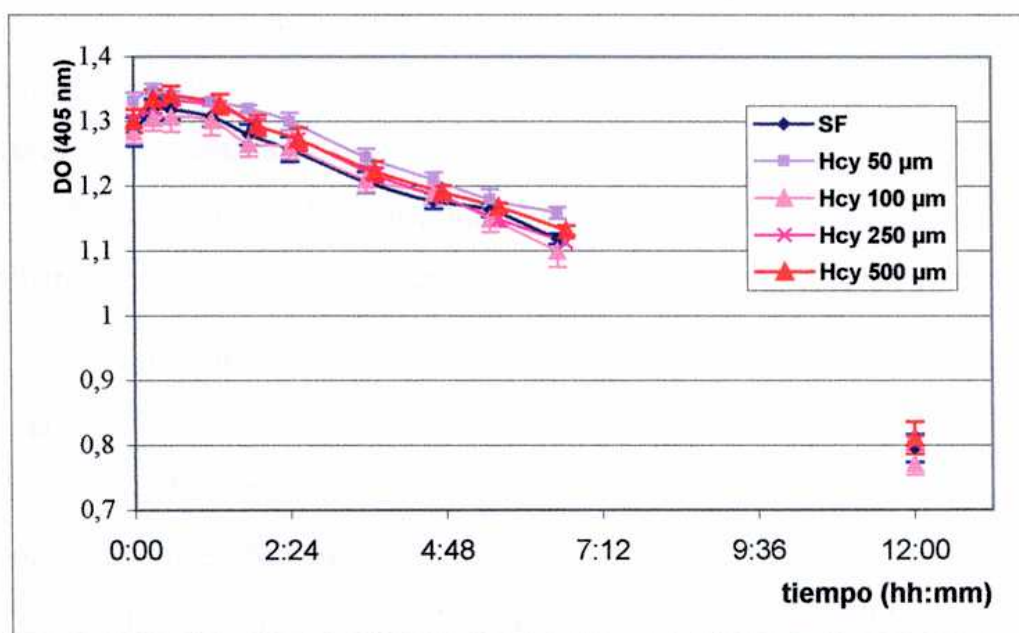
b) t-PA (20 U/pocillo) y Hcy (c.f. = 500  $\mu\text{M}$ ).

Control: t-PA: (20 U/pocillo) + SF

**Figura 69:** Fibrinoformación de fibrina obtenida en ausencia de Hcy.



**Figura 70:** Lisis de redes plasmáticas estándar, con (u-PA + Hcy).



**Figura 71:** Lisis de redes plasmáticas estándar, con t-PA en presencia de Hcy.

Los tiempos de lisis con (UK + Hcy) o (t-PA + Hcy) de fibrina plasmática (formada en ausencia de Hcy), no resultaron diferentes de sus correspondientes controles (con SF en lugar de Hcy), lo que indicaría que la actividad de los componentes del sistema fibrinolítico no se ve afectados por el aminoácido.

## DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las características de los geles de fibrina obtenidos en presencia de Hcy descritos en las secciones precedentes, surgió el interés en esclarecer si la lisis de estas redes estaría afectada. Por otro lado, los niveles aumentados de Hcy podrían modificar la cinética de generación de plasmina y/o su actividad biológica. Por lo tanto, en esta sección se llevaron a cabo experimentos para determinar la lisabilidad de la fibrina formada en presencia de Hcy y evaluar el efecto del aminoácido sobre componentes del sistema plasminógeno-plasmina.

Al evaluar el efecto de la Hcy sobre la formación y lisis de la fibrina utilizando el sistema desarrollado en una sola etapa, los resultados muestran que el tiempo de lisis con Hcy fue levemente mayor que el del control, aunque las diferencias no resultaron significativas (Fig 66, Tabla 32), indicando que este sistema fue incapaz de detectar, aún, aquellas diferencias obtenidas en la sección de fibrinoformación (Fig 42, Pág. 117).

A continuación se discuten las experiencias realizadas con u-PA. Los resultados de los ensayos en dos etapas muestran que la fibrina asociada a Hcy resultó más difícil de lisar cuando se utilizó u-PA. Por el contrario, cuando se lisaron geles obtenidos en "ausencia de Hcy", con u-PA preincubado con Hcy, se obtuvieron los mismos tiempos de lisis que el control (u-PA preincubado con SF). Por otra parte, el aminoácido no mostró efecto en la actividad de plasmina (Fig 62, Tabla 30) ni en la activación del Plg (Fig 63, Tabla 31) determinadas por el método amidolítico utilizado, sugiriendo que la Hcy no afectaría a los componentes fibrinolíticos evaluados. Weisel y colaboradores mostraron que la velocidad de fibrinolisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina<sup>148</sup>. La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que fibras gruesas son más lentamente lisadas que las finas<sup>151,152</sup>. Por otra parte, redes de fibrina ramificadas y compactas son digeridas con mayor dificultad a causa de la elevada cantidad de

fibras por unidad de volumen y la baja difusión de componentes fibrinolíticos en esta estructura compacta <sup>145,205</sup>. Por lo tanto, considerando que la Hcy indujo redes de fibrina compactas y ramificadas, con fibras más cortas y gruesas que los controles (resultados de MEB) puede postularse que la lisis prolongada con u-PA, estaría más asociada a la estructura compacta de la fibrina que a modificaciones en la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados.

Según reportes bibliográficos que evaluaron la fibrinólisis en diferentes condiciones de permeabilidad <sup>144</sup>, la disolución de la fibrina en ausencia de flujo, está controlada por la velocidad a la cual la plasmina o los activadores del plasminógeno alcanzan a sus sustratos, o sea por la difusión de estos componentes. Las proteínas que no se unen a la fibrina (como el u-PA) pueden moverse libremente a través de la matriz de fibrina mientras no le ofrezca obstáculo estérico. Sin embargo especies que se unen a la fibrina (como t-PA, plasminógeno o plasmina) pueden unirse a las fibras y permanecer prácticamente inmóviles. Integrando los resultados de lisis y los de permeabilidad puede inferirse que la difusión de u-PA estaría ligeramente dificultada en geles poco permeables, con esqueleto de fibrina altamente ramificado, como los obtenidos con Hcy. Coincidentemente, se ha reportado que a bajas concentraciones de u-PA, los geles de fibrina gruesos fueron lisados más lentamente que los finos <sup>144</sup>. Por lo tanto, se fortalece el concepto de que la lisis prolongada se asociaría a diferencias en la estructura, involucradas en las diferencias de la permeabilidad, descartando el efecto del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos.

Respecto a la lisis inducida por t-PA de redes de fibrina producidas en presencia de Hcy, se observaron resultados similares al control (Figura 68). Según lo descrito para el u-PA, la estructura compacta de la fibrina asociada a la Hcy debería haber mostrado tiempos de lisis prolongados. Sin embargo el mecanismo de acción diferente del t-PA explicaría los resultados inesperados. La fibrina, el principal sustrato de la plasmina, une Plg y t-PA y acelera la activación del Plg, mientras que el u-PA no tiene afinidad por la fibrina y activa Plg en fase fluida. La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg depende

de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor<sup>153</sup>. Entonces, la estructura densa de la fibrina asociada a Hcy sería, por un lado, más difícil de lisar, pero por otro, las fibras más gruesas proveen más sitios de unión a t-PA, favoreciendo la activación del Plg. Estos efectos contrapuestos explicarían que los tiempos de lisis obtenido con t-PA no mostraran diferencias entre las redes con Hcy y el control.

Estos resultados coinciden con los reportados en la bibliografía. Sauls *et al* encontraron disminuida la lisabilidad con plasmina, de fibrina obtenida a partir de Fbg aislado de plasma de conejos a los que se administró DL-Hcy<sup>172</sup>.

***En conclusión, los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó u-PA. Esta alteración estaría asociada a la estructura de la fibrina, causados por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados (Plg, plasmina, u-PA y t-PA).***

***CONCLUSIONES***



La trombosis es considerada una patología multicausal resultante de la interacción de factores genéticos y adquiridos. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre los niveles elevados de Hcy y enfermedad vascular. Actualmente, la hiperhomocisteinemia es considerada un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva y en particular para la trombosis. Para establecer si la Hcy es la responsable del riesgo de trombosis se están llevando a cabo numerosos estudios randomizados que intentan determinar si el descenso de los niveles de Hcy puede reducir los eventos trombóticos.

Se han realizado numerosas experiencias *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales con el fin de interpretar la relación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad aterotrombótica. De estos estudios se ha postulado que la Hcy podría incrementar la generación de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos y superóxidos que aumentarían el estrés oxidativo. Además, podría limitar la biodisponibilidad del óxido nítrico, estimular la proliferación de células de músculo liso, alterar la elasticidad de la pared vascular, entre muchas otras acciones. Estos hallazgos sugieren que la Hcy provocaría disfunción endotelial, con la consecuente activación plaquetaria y alteración de los sistemas de coagulación, fibrinolítico y sus inhibidores fisiológicos. Sin embargo los mecanismos involucrados no han sido esclarecidos. La mayoría de los investigadores han estudiado la disfunción endotelial y la actividad procoagulante entre otros efectos dañinos de los niveles elevados de Hcy, evaluando eventos que preceden a la formación del trombo, pero no se ha investigado sobre los efectos del aminoácido luego de iniciado el proceso de coagulación. En el desarrollo de este trabajo de tesis se ha evaluado la acción de la Hcy sobre las características del coágulo de fibrina y su lisis, así como su efecto sobre componentes plasmáticos del sistema de coagulación y del fibrinolítico.

En la formación de la fibrina pueden diferenciarse tres sucesos fundamentales: la liberación de los fibrinopéptidos, el ensamble de los

monómeros de fibrina y la estructura de la fibrina resultante. Alteraciones en este proceso pueden conducir a modificaciones en el entrecruzamiento, en la funcionalidad de la fibrina o en su susceptibilidad a la proteólisis. El objetivo principal de la presente tesis fue evaluar si la Hcy podría ser responsable de alguna/s de las alteraciones mencionadas. En este sentido el trabajo se inició con la evaluación de la cinética de fibrinoformación registrando los cambios en la DO. ***En estos ensayos la Hcy no modificó la liberación de los fibrinopéptidos ni la velocidad de fibrinoformación, aunque, mostró que la DO máxima de la fibrina asociada a la Hcy resultó mayor que el control, sugiriendo cambios en su arquitectura.*** Se analizó su estructura por estudios de microscopía electrónica, mostrando que la fibrina asociada a la Hcy fue diferente del control, formando una trama más densa y muy ramificadas. El análisis cuantitativo de las imágenes mostró diferencias significativas respecto a los controles que demostraron que ***la Hcy produjo cambios de estructura en la fibrina plasmática, de modo que se formaron redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control.***

Estos hallazgos plantearon el interés por investigar otras características de la fibrina, probablemente también modificadas por la acción de la Hcy. Utilizando tromboelastografía se evaluó si la Hcy modificaría la solidez de los coágulos. ***Los resultados de los tromboelastogramas realizados con sangre entera incubada con Hcy mostraron incremento de la velocidad de formación de trombina y consecuentemente de la de fibrina.*** Además, el aumento de la amplitud de los trazados tromboelastográficos se asocia al incremento de la rigidez en los coágulos sanguíneos obtenidos. De modo que ***se formaron coágulos más rígidos en forma dependiente de la concentración de Hcy agregada.***

***En las experiencias realizadas a partir de pool de plasmas desplaquetizados (PN\*) no se observaron diferencias significativas en las variables evaluadas,*** probablemente por la baja sensibilidad del equipo cuando se utiliza un sistema libre de células.

Para evaluar la respuesta de los “geles de fibrina” a pequeñas deformaciones (sin alterar su estructura), se realizaron diversos estudios en un reómetro de esfuerzo tangencial. **Se verificaron cambios en la consistencia de geles de fibrina obtenidos en presencia de Hcy, detectados por el aumento del módulo de almacenamiento ( $G'$ ), del módulo de pérdida ( $G''$ ) y del % de deformación que son capaces de soportar estos geles sin que se altere su estructura. Se concluye que los geles de fibrina obtenidos en presencia de Hcy tienen el componente fluido más viscoso y compartimentalizado dentro de una estructura sólida más entrecruzada, dando lugar a un gel más rígido y menos deformable.**

Se realizaron ensayos de compactación para evaluar el comportamiento de la fibrina en respuesta a fuerzas externas. **La compactación de geles de fibrina provenientes de plasmas incubados con Hcy resultó levemente disminuida respecto a los controles, aunque no significativamente. En cambio, cuando se utilizó Fbg purificado incubado con Hcy, se provocaron cambios en la fibrina que se manifestaron por la formación de geles más resistentes a la fractura por efecto de fuerzas centrífugas y/o porque los compartimentos líquidos serían más pequeños.** Se sugiere que la Hcy modificarían la hidratación de la molécula de fibrinógeno.

Cuando se evaluaron los tiempos de coagulación por el método de Clauss, los plasmas preincubados con Hcy produjeron una disminución significativa respecto al control, independientemente de la concentración utilizada. En cambio, los tiempos de *Reptilase*® resultaron iguales que los controles. Estos datos parecen indicar que la Hcy produciría cambios sobre la cadena B $\beta$  del Fbg, favoreciendo el proceso de gelificación.

Se realizaron ensayos de permeabilidad de geles de fibrina plasmáticos y de sustancias puras. **La permeabilidad de geles de fibrina plasmática disminuyó al aumentar la concentración de Hcy.** El aminoácido podría alterar algunos grupos funcionales del Fbg, y por consiguiente las cargas electrostáticas de la molécula, originando redes de fibrina de distinta estructura y/o distribución

diferente de las moléculas de agua, generando un gel menos permeable. Cuando se analizaron geles de fibrina obtenidos a partir de Fbg preincubado con Hcy, la permeabilidad también resultó disminuida. Del mismo modo, se observó que el FXIII tratado con Hcy produjo geles de fibrina menos permeables. Estos resultados indican que el Fbg y el FXIII estarían afectados por la acción del aminoácido. ***Se concluyó que la Hcy generó cambios en el Fbg (posiblemente sobre la cadena B $\beta$ ) y el FXIII, responsables del descenso de permeabilidad de la fibrina. La permeabilidad disminuida dificultaría la difusión de componentes plasmáticos involucrados en la fibrinolisis.*** Las modificaciones de ambas moléculas (Fbg y FXIII) serían responsable de los cambios estructurales, reométricos y de permeabilidad detectados en la fibrina en el presente estudio.


Los resultados precedentes permiten evaluar la acción de la Hcy sobre la cinética de formación y diversas propiedades de la fibrina. Por un lado, la microscopía electrónica de la fibrina formada en presencia de Hcy, mostró una estructura más compacta y ramificada que, teóricamente, sería más difícil de lisar. Por otro lado, la permeabilidad disminuida avaló el concepto de estructura compacta, sugiriendo que el transporte de los componentes que intervienen en la fibrinolisis estaría dificultado. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la Hcy sobre la actividad del sistema plasminógeno-plasmina, estudiando: la actividad amidolítica de la plasmina, la activación del plasminógeno, la lisabilidad de la fibrina obtenida en presencia de Hcy y la lisis de redes de fibrina estandar.

***Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó u-PA. Esta alteración estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados (Plg, plasmina, u-PA y t-PA).***

Este trabajo fue totalmente realizado *in vitro* para separar los diferentes efectos que ejerce la Hcy y poder postular mecanismos que expliquen la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva. Extrapolar estos resultados a lo que podría pasar *in vivo* tendrían importantes consecuencias. A partir de los resultados de las experiencias *in vitro*, podría inferirse que los

pacientes hiperhomocisteinémicos producirían un coágulo con una estructura anormal, más compacta y más resistente a la lisis, generando un estado procoagulante *in situ*, ya que, no sólo aumentaría la permanencia del trombo en el vaso afectado, sino que también se dificultaría la acción de las drogas trombolíticas. La obstrucción en la circulación conduciría a la alteración de la reología normal y a la cascada de eventos que desembocarían en enfermedad aterotrombótica.

Los resultados de este trabajo de tesis contribuyen a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de la hiperhomocisteinemia y el riesgo de trombosis.



Dra. Lucía C. Kordich  
Profesora Consultante Titular  
Fac. Ciencias Exactas y Naturales U.B.A.



## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. **Mc Cully K.** Vascular pathology of homocysteinaemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-128
2. **Wilcken D, Wilcken B.** The pathogenesis of coronary artery disease. Possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57:1079-1082.
3. **Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG,** 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA* 1995; 274:1049-1057.
4. **Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et al.** Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332:286-291.
5. **Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Andrieu S, et al.** Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(2):643S-649S.
6. **Regland B, Andersson M, Abrahamson L, Bagby J, Dyrehag L, Gottfries C.** Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol* 1997; 26:301-307.
7. **Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al.** Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 200; 71(4):962-968.
8. **Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF.** Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(4):781-785.
9. **Mc Mullin MF, Young PB, Bailie KE, Savage GA, Lappin TR, White R.** Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol* 2001; 23:161-165.
10. **Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al.** Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; 79:1180-1188.
11. **D'Angelo A, Selhub J.** Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90:1-11.
12. **Ubbink J, Becker P, Hayward Vermaak WJ, Delport R.** Results of B-Vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem* 1995; 41(7):1033-1037.
13. **Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, Pedersen A, Dybkjaer L.** Age and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996; 42(4):630-636.
14. **Quintana I.** Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático. *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2003.*
15. **Nygård O, Vollset SE, Refsum H, et al.** Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA* 1995; 274:1526-1533.

16. **Hermann W, Quast S, Ullrich M, et al.** Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: Relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetradrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 1999; 144:91-101.
17. **Wouters MG, Morres MT, van der Mooren MJ, et al.** Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:801-805.
18. **Genoud V, Castañón M, Annichino-Bizzacchi J, Korin J, Kordich L.** 19- Prevalence of three prothrombotic polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. *Thromb Res* 2000; 100:127-131.
19. **Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE.** Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:263-270.
20. **Stolzenberg-Solomon R, Miller E, Maguire M, Selhub J, Appel L.** Association dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:467-475.
21. **Hernanz A, Plaza A, Martin-Mola E, De Miguel E.** Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 1999; 32:65-70.
22. **Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, et al.** Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: finding in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996; 26:27-34.
23. **Nygård O, Nordrehaug E, Refsum H, et al.** Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230-236.
24. **Morris MS, Jacques PF, Rosenberg TH, et al.** Serum total homocysteine concentration is related to self-reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III. *J Nutr* 2000; 130(12):3073-3076.
25. **Arnesen E, Refsum H, Bonan KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE.** Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24:704-709.
26. **Bos MJ, van Goor ML, Koudstaal PJ, Dippel DW.** Plasma homocysteine is a risk factor for recurrent vascular events in young patients with an ischaemic stroke or TIA. *J Neurol.* 2005 Mar; 252(3):332-7.
27. **Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al.** Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775-1781.
28. **Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, et al.** Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 345:882-885.
29. **Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM.** High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1080-1083.



30. **Ray JG.** Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Inter Med* 1998; 158(19):2101-2116.
31. **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al.** Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997; 95:1777-1782.
32. **Den Heijer M, Lewintong S, Clarke R.** Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3:292-99.
33. **Neal B, MacMahon S, Ohkubo T, Tonkin A, Wilcken D; PACIFIC Study Group.** Dose-dependent effects of folic acid on plasma homocysteine in a randomized trial conducted among 723 individuals with coronary heart disease. *Eur Heart J.* 2002; 23 (19):1482-4.
34. **Schwammenthal Y, Tanne D.** Homocysteine, B-vitamin supplementation, and stroke prevention: from observational to interventional trails. *Lancet Neurol.* 2004;3(8):493-5.
35. **Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al.** Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004 Feb 4;291(5):565-75.
36. **Mason PJ, Manson JE, Sesso HD, Albert CM, Chown MJ, Cook NR, Greenland P, Ridker PM, Glynn RJ.** Blood pressure and risk of secondary cardiovascular events in women: the Women's Antioxidant Cardiovascular Study (WACS). *Circulation.* 2004 Apr 6, 109(13):1623-9.
37. **Davie E.** Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thomb. Haemost.* 1995; 74 (1):1-6
38. **Rodgers GM.** Endothelium and the regulation of hemostasis. En: *Lee, Foerster, Lukens, Paraskevas, Greer, Rodgers, Eds. Wintrobe's Clinical Hematology. Baltimore Maryland – EEUU, 10<sup>th</sup> editio; 1999. p. 765-73.*
39. **Andree HAM, Nemerson Y.** Tissue factor: regulation of activity by flow and phospholipid surfaces. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; 6:189-197.
40. **Morrison JH, Neuenschwander PF, Huang Q, Mc Callum CD, Su B, Johnson AE.** Factor VIIa-Tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions. *Thomb. Haemost.* 1997; 78 (1):112-116.
41. **Banner DW.** The factorVIIa/tissue factor complex. *Thomb. Haemost.* 1997; 78 (1):512-515.
42. **Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Pemberton S, Tuddenham EGD.** Inherited factor X deficiency: molecular genetics and pathophysiology. *Thomb. Haemost.* 1997; 78 (1):161-172.
43. **Rosing J, Tans G.** Coagulation factor V: an old star shines again. *Thomb. Haemost.* 1997; 78 (1):427-433.

44. **Broze GJ, Gailani D.** The role of factor XI in coagulation. *Thomb. Haemost.* 1993; 70 (1):72-74.
45. **Mosesson MW.** Fibrinogen structure and fibrin clot assembly. *Sem Thromb Haemost* 1998; 24:169-74.
46. **Bithell TC.** Blood coagulation. En Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Wintrobe's Clinical Hematology. Tomo I. *Lea & Febiger editors, 9<sup>o</sup> edición, Londres, 1993; Pag 566-615.*
47. **Osterud B.** Tissue factor: a complex biological role. *Thomb. Haemost.* 1997; 78 (1):755-758.
48. **Lindhout T, Salemink I, Valentin S, Willems G.** Tissue factor pathway inhibitor, regulation of its inhibitory activity by phospholipid surface. *Haemost.* 1996; 26 (4): 89-97.
49. **Esmon CT, Ding W, Yasuhiro K, Gu JM, Ferrel G, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mather T, Iaszik Z, Esmon NL.** The protein C pathway: New insights. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1):70-4.
50. **Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH.** Binding of protein S to Factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268 (4):2872-2877.
51. **Rosemberg RD, Damus PS.** The purification and mechanism of action of human antithrombin- heparin cofactor. *J Biol Chem* 1973; 248: 6490- 6505.
52. **Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike R, Carrel RW.** The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:14683-88.
53. **Huisman LGM, Van Griensven Jm, Kluft C.** On the role of C1 inhibitor as inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemost* 1995; 73:466-471.
54. **Martinuzzo M, Cerrato G, Forastiero R.** Fisiología de la Hemostasia. En *Lucía Kordich (editor en Jefe). Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de Hemostasia. Grupo CAHT. Primera edición 2003, pág 8-16.*
55. **Jenny NS, Mann KG.** Coagulation cascade: An overview En: *Lozcalzo J and Schafer AI Eds. Thrombosis and Hemorrhage. Baltimore, Maryland, EUA, 2th ed. 1998, Cap. 1, pág 3-28.*
56. **Collman R, Hirsh J, Marder V, Clowes A.** Overview of coagulation and fibrinolysis, and their regulation. En: *Collman R, Hirsh J, Marder V, Clowes A, George J, Lippincott, Williams and Wilkins. (editors). Hemostasis and Trombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Maryland EUA, 4<sup>th</sup> Edition, 2001, Cap 2. Pag 17-21.*
57. **Henschen A, Lottspeich F, Kehl M et al.** Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408:28-43.

58. **Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E et al.** A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* 1985;230:1388-1391.
59. **Huber P, Laurent M, Dalmon J.** Human beta-fibrinogen gene expression. *J Biol Chem* 1990; 265:5695-5701.
60. **Blombäck B.** Fibrinogen and fibrin. Proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 1996; 83 (1):1-75.
61. **Mosher DF.** Crosslinking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J Biol Chem* 1975; 250:6614-6621.
62. **Kimura S, Aoki N.** Crosslinking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biol Chem* 1986;261:15591-15595.
63. **Doolittle RF.** The structure and evolution of vertebrates fibrinogen. *Ann NY Acad Sci* 1983; 408:13-27.
64. **Chung DW, Chan WY, Davie EW.** Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for the gamma chain of human fibrinogen. *Biochem* 1983; 22:3250-3256.
65. **Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW et al.** Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10729-10732.
66. **Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW.** Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry* 1996;35:10448-10453.
67. **Regañón E, Vila V.** Estructura y Bioquímica del fibrinógeno. En: *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Editorial Universidad de Salamanca, 1992, Capítulo 41 Vol III, pág. 435.*
68. **Dejana E, Zanetti A, Conforti LG.** Biochemical and functional characteristics of fibrinogen interaction with endothelial cells. *Haemostasis* 1988; 18:262-270.
69. **Cratree G, Comeau C, Fowlkes D, Fornace A, Malley J, Kant J.** Evolution and structure of the fibrinogen genes. Random insertion of introns or selective loss? *J Biol Chem* 1985; 185:1-19.
70. **Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman C.** Intracellular assembly of human fibrinogen. *J Biol Chem* 1983; 258:13.407-13.410.
71. **Meade T, Imeson A, Striling Y.** Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet* 1987; 2(8566):986-988.
72. **Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan Bengtsen K, Larson B, Wellin L, Tibblin G.** Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984; 311: 501-505.
73. **Meade T, Chacarabarti R et al.** Haemostatic function and cardiovascular death: Early results of a prospective study. *Lancet* 1980; May 17;1(8177):1050-4.

74. **Meade T, Brosovic M, Chacarabarti R et al.** Haemostatic function and ischaemic heart disease: Principal results of Northwick Parck Heart study. *Lancet* 1986; 2(8506):533-536.
75. **Nieuwenhuizen W, Haverkate F.** Calcium-binding regions in fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1983;408:92-96.
76. **Hardy JJ, Carrell NA, McDonagh J.** Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 1983;408:279-287.
77. **Martínez 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; 61:1196-1202.
78. **McDonagh J.** Dysfibrinogenemia and other disorders. In: *Collman R, Hirsh J, Marder V, Clowes A, George J, Lippincott, Williams and Wilkins. (editors). Hemostasis and Trombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Maryland EUA, 4<sup>th</sup> Edition, 2001, Cap 53. pag 855-893.*
79. **Okude M, Yamanaka A, Morimoto Y, Akihama S.** Sialic acid in fibrinogen: effects of sialic acid on fibrinogen-fibrin conversion by thrombin and properties of asialo fibrin clot. *Biol Pharm Bull.* 1993 May;16(5):448-52.
80. **Tulinsky A.** Molecular interaction of thrombin. *Semin Thromb Haemost* 1996; 22 (2):112-124.
81. **Côté HCF, Bajzar L, Steevens WK, Samis JA, Morser J, Mac Gillivray RTA, Nesheim ME.** Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizothrombin(desF1). *J Biol Chem* 1997; 272 (10):6194-6200.
82. **Guillin MC, Bezeaud A, Bouton MC, Jandrot-Perrus M.** Thrombin specificity. *Thromb Haemost* 1995, 74 (1):129-133.
83. **Fenton JW II.** Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb Haemost* 1995; 74 (1):493-8.
84. **Greenberg CS, Orthner CL.** Blood coagulation and fibrinolysis. En: *Lee, Foerster, Lukens, Paraskevas, Greer, Rodgers, Eds. Wintrobe's Clinical Hematology. Baltimore Maryland – EEUU, 10<sup>th</sup> editio; 1999. p. 684-764.*
85. **Lewis SD, Shields PP, Shafer JA.** Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin. *J Biol Chem* 1985;260:10192-10199.
86. **Doolittle RF, Yang Z, Mochalkin I.** Crystal structure studies on fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:31-43.
87. **Medved L, Nieuwenhuizen W.** Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89:409-419.
88. **Weisel J, Veklich Y and Gorkun O.** The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J. Mol. Biol* 1993; 232: 285-297.

89. **Medved L, Gorkun O, Privalov P.** Structural organization of C-terminal parts of fibrinogen A $\alpha$ -chains. *FEBS Lett* 1983; 160:291-5.
90. **Medved L, Litvinovich S, Ugarova T, Matsuka Y, Ingham K.** Domain structure, stability and functional activity of the recombinant human fibrinogen  $\gamma$ -module ( $\gamma$ 148-411). *Biochem* 1997; 36:4685-93.
91. **Weisel JW, Medved L.** The structure and functions of the  $\alpha$ C domains of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:312-327.
92. **Erickson HP, Fowler WE.** Electron microscopy of fibrinogen, its plasmic fragments and polymers. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408:146-63.
93. **Gorkun OV, Veklich YI, Medved LV, Henschen AH, Weisel JW.** Role of the  $\alpha$ C domains of fibrin in clot formation. *Biochemistry* 1994; 33:6986-6997.
94. **Wiltzius P, Dietler G, Kanzing W et al.** Fibrin aggregation before sol-gel transition. *Biophys J* 1982; 38:123-132.
95. **Scheraga HA.** Interaction of thrombin and fibrinogen and the polymerization of fibrin monomer. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408:330-343.
96. **Doolittle RF.** Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem* 1984; 53:195-229.
97. **Ichinose A.** Physiopathology and regulation of FXIII. *Rev. Thromb Haemost* 2001; 86:57-65.
98. **Muszbek L, Yee VC, Hevvesy Z.** Blood coagulation F XIII: structure and function. *Rev. Thromb Res* 1999; 94:271-305.
99. **Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW.** Protransglutaminase (Factor XIII) Mediated Cross-linking of Fibrinogen and Fibrin. *Thromb Haemostasis* 2001; 86:1221-1228.
100. **Hettasch JM, Greenberg CS.** Fibrin formation and stabilization. En: *Lozcalzo J and Schafer AI Eds. Thrombosis and Hemorrhage. Baltimore, Maryland, EUA, 2th ed. 1998, Cap. 6, pág 129-176.*
101. **Anwar R, Miloszewski KJ.** Factor XIII deficiency. *Rev. Br J Haematol* 1999; 107 (3):468-84.
102. **Ferry JD, Miller M, Shulman S.** The conversion of fibrinogen to fibrin. VII. Rigidity and stress relaxation of fibrin clots; effect of calcium. *Arch Biochem Biophys* 1951; 34:424-36.
103. **Roberts WW, Lorand LL, Mochros LF.** Viscoelastic properties of fibrin clots. *Biorheology* 1973; 10:29-42.
104. **Mochros LF, Roberts WW, Lorand LL.** Viscoelastic properties of ligation-inhibited fibrin clots. *Biophys chem* 1974; 2:164-9.
105. **Glover CJ, Mc Intire LV, Brown CH, Natelson EA.** Rheological properties of fibrin clots. Effect of fibrinogen concentration, factor XIII deficiency, and factor XIII inhibition. *J Lab Clin Med* 1975; 86:644-56.

106. **Shen LL, Hermans J, Mc Donagh J, Mc Donagh RP, Carr M.** Effecto of calcium ion and covalent cross-linking on formationa and elasticity of fibrin gels. *Thromb Res* 1975; 6:255-65.
107. **Shen LL, Lorand L.** Contribution of fibrin stabilization to clot strength. Supplementation of F XIII-deficient plasma with the purified zimogen. *J Clin Invest* 1983; 71:1336-41.
108. **Gladner JA, Nossal R.** Effects of cross-linking on the rigidity and proteolytic susceptibility of human fibrin clots. *Thromb Res* 1983; 30:273-88.
109. **Shen LL, Mc Donagh RP, Mc Donagh J, Hermans J.** Fibrin gel structure: Influence of calcium and covalent cross-linking on the elasticity. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 56:793-8.
110. **Blombäck B, Banerjee D, Carlsson K, Hamsten A, Hessel B, Procyk R, Silveira A, Zacharski L.** Native fibrin gel networks and factors influencing their formation in health and disease. *Adv Exp Med Biol.* 1990;281:1-23.
111. **Marx G.** Divalent cations induce protofibril gelation. *Am J Hemat* 1988; 27:104-109.
112. **Okada M, Blombäck B.** Calcium and fibrin gel structure. *Tromb Res* 1983; 29: 69-280.
113. **Hassel B, Fatah K.** The influence of zinc ions on fibrin gel structure. *Thromb Haemost* 1997; (suppl):39.
114. **Fatah K and Hessel B.** Effect of zinc ions on fibrin network structure. *Blood Coag and Fibrinolysis* 1998; 9:629-635.
115. **Okada M, Blombäck B.** Factors influencing fibrin gel structure studing by flow measurements. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408: 233-253.
116. **Blombäck B, Carlsson K, Hessel B et al.** Native fibrin gel networks observed by 3 D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997:96-110.
117. **Blombäck 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: 521-538.
118. **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: 477-485.
119. **Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hassel B, Johnsson H, el al.** Altered properties of the fibrin gel structure in the patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39:1519-1532.
120. **Gunter A, Kalinowski M, Rosseau S, Seeger W.** Surfactant incorporation markedly alters mechanical properties of a fibrin clot. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995 Dec;13(6):712-17.

121. **Okada M, Blomback B, Chang MD, Horowitz B.** Fibronectin and fibrin gel structure. *J Biol Chem.* 1985 Feb 10;260(3):1811-20.
122. **Marchi R, Mirshahi S, Soria C, Mirshahi M, Zohar M, Collet JP, de Bosch NB, Arocha-Piñango CL, Soria J.** Thrombotic dysfibrinogenemia: Fibrinogen "Caracas V" relation between very tight fibrin network and defective clot degradability. *Thromb Res* 2000; 99:187-193.
123. **Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N, Sameshima M, Mimuro J, Weisel J, Nagita A, Matsuda M.** End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with a B $\beta$ -chain extension lead to fragile clot structure. *Blood* 2000; 96:3779-85.
124. **Hessel B, Silveira A, Carlsson K, Oksa H, Rasi V, et al.** Fibrinogenemia Tampere. A dysfibrinogenemia with defective gelation and thromboembolic disease. *Thromb Res* 1995; 78 (4):323-39.
125. **Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M, Hamsten A.** Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structure in men with myocardial infarction at a young age. *Throm Haemost* 1996; 76:535-540.
126. **Blombäck M, Kronlund P, Aberg B, Katah K, Hansson LO, Egberg N, et al.** Pathologic fibrin formation and cold-induced clotting of membrane oxygenators during cardiopulmonar bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995; 9:34-43.
127. **Kordich L, Duboscq C, Quintana, Rossi E.** Bases del Diagnóstico Biológico en Hemostasia y Trombosis: El Sistema Plasminógeno-Plasmina *Informe ALAC, AÑO II, N°2, 1997.*
128. **Collen D.** The Plasminogen (Fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 1999; 82: 259-270.
129. **Bachman F.** Plasminogen-Plasmin Enzyme System, en Verstraete, M, Vermylen J, Lijnen R, Arnout J. (Ed.) *Thrombosis and Hemostasis.* Leuven University Press. 1987, 275-301.
130. **Araujo de Campos M.** Fisiopatología del sistema fibrinolítico y sus inhibidores. En: *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología.* Editorial Universidad de Salamanca. 1992, Capítulo 34 Vol III, pág. 169-182.
131. **Carr ME, Alving BM.** Effect of fibrin structure on plasmin mediated dissolution of plasma clots. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; 6:567-573.
132. **Pointing CP, Marshall JM, Cederholm Williams SA.** Plasminogen: a Structural Review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3:605-614.
133. **Schousboe I, Feddersen K, Rojkjaer R.** Factor XIIa is a kinetically favorable plasminogen activator. *Thromb Haemost* 1999;82:1041-1046.
134. **Bachman F.** Plasminogen Activators. En: *Collman RW, Hirsh J, Murder V, Salzman ED (ed). Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice, Second Edition, J Lippincott* 1987, 318-339
135. **Lijnen HR and Collen D.** Fibrinolytic agents: Mechanisms of activity and pharmacology. *Thomb. Haemost.* 1995; 74 (1):387-396.

- 135b: **Van de Werf JF**. The ideal fibrinolytic: can drug design improve clinical results? *European Heart J* 1999; 20:1452-1458.
136. **Vassalli JD**. The urokinase Receptor *Fibrinolysis* 1994; 8 (1):172.
137. **Moyer M**. Biochemical and biological aspects of the plasminogen system. *Clin. Biochem* 1990; 23:197.
138. **Blasi F, Vassalli JD, Dano K**. Urokinase-type plasminogen activator: Proenzyme, receptor and inhibitors. *J Cell Biol* 1987; 104.
139. **Collen D, Lijnen HR**. Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis. *Blood* 1991; 78:3114-3124.
140. **Sprengers ED, Kluft C**. Plasminogen activator inhibitors. *Rev. Blood* 1987; 69:381-387.
141. **Lawrence DA, Palaniappan S, Stefansson S et al**. Characterization of the binding of different conformational forms of plasminogen activator inhibitor-1 to vitronectin. Implications for the regulation of pericellular proteolysis. *J Biol Chem* 1997; 272:7676-7680.
142. **Deng G, Royle G, Seiffert D and Lorkutoff DJ**. The PAI-1/Vitronectin interaction: two cats in the bag? *Thomb. Haemost.* 1995; 74 (1):66.
143. **Hoylaerts M, Rijken D, Lijnen H, Collen D**. Kinetics of activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:2912.
144. **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.
145. **Kolev K, Machovich R**. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003;89:610-21
146. **Collen D, Lijnen HR**. Molecular and Cellular Basis of Fibrinolysis. En: *Ed. Churchill-Livingstone. Hematology Basic Principles and Practices*, pag. 1233.
147. **Plow E, Felez J, Miles L**. Cellular Regulation of Fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1991; 66(1):32.
148. **Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C**. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 1999; 82 (2):277-282.
149. **Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al**. Native fibrin gel network observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997:96-110.
150. **Diamond SL, Anand S**. Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophys J* 1993; 65: 2622-43.
151. **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; 20:1354-1361.
152. **Sabovic M, Blinc A.** Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. En: *Eur J Physiol* (2000) 440 [Suppl]: R134-R136.
153. **Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM.** The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 1992; 267:24259-24263.
154. **Misra H.** Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols. *J Biol Chem* 1974; 249:2151-2155.
155. **Welch GN, Loscalzo J.** Homocysteine and atherothrombosis. *N England J Med* 1998; 338:1042-1050.
156. **Jacobsen D.** Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998; 44(8):1833-1843.
157. **Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M.** Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* 2001; 104 (10):1165-1170.
158. **Van Guldener C, Stehouwer C.** Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3):281-289.
159. **Wang H, Yoshizumi M, Lai K, et al.** Inhibition of growth and p 21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997; 272:25380-25385.
160. **Mujumdar V, Aru G, Tgagi S.** Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 2001; 82 (3):491-500.
161. **Majors A, Ehrhart L, Pezacka E.** Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2074-2081.
162. **Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG.** Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001; 276:4389-97.
163. **Zarychanski R, Houston DS.** Plasma homocysteine concentration is not associated with activated protein C resistance in patients investigated for hypercoagulability. *Thromb Haemost* 2004; 91:1115-22.
164. **Kuch B, Bobak M, Fobker M, et al.** Associations between homocysteine and coagulation factors-A cross-sectional study in two populations of central Europe. *Thromb Res* 2001; 103:265-273.
165. **Yarnell J, Sweetnam P, Rumley A, Lowe G.** Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(1):271-279.
166. **Ebbesen LS.** Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004 Dec;50(8):917-30.

167. **Bienvenu T, Ankri A, Chadefaux B, Montalescot G, Kamoun P.** Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb Res* 1993; 70:123-129.
168. **Tofler G, D'agostino R, Jacques P, et al.** Association between increased homocysteine levels and impaired fibrinolytic potential: potential mechanism for cardiovascular risk. *Thromb Haemost* 2002; 88:799-804.
169. **Chia S, Wilson R, Ludlam CA, Webb DJ, Flapan AD, Newby DE.** Endothelial dysfunction in patients with recent myocardial infarction and hyperhomocysteinaemia: effects of vitamin supplementation. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Jan;108(1):65-72.
170. **Collet JP, Misal Z, Lesty C et al.** Abnormal fibrin clot architecture in nephritic patients is related to hypofibrinolysis: Influence of plasma biochemical modifications. A possible mechanism for the high thrombotic tendency? *Thromb Haemost* 1999; 82:1482-9.
171. **Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M, Alvarez-Sabin J.** Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2004 Sep;35(9):2123-7.
172. **Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M.** Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (2):300-6.
173. **Lottenberg R, Jackson CM.** Solution composition dependent variation in extinction coefficients for *p*-nitroaniline. *Biochim Biophys Acta* 1983;742:558-564.
174. **Biggs R.** Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis. *Oxford: Blackwell Sc. Publications; 1976.*
175. **Marklands FS Jr.** Inventory of a and b fibrinogenases from snake venoms. *For the subcommittee on Nomenclature of Exogenous hemostatic factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis* 1991; 65: 438-443.
176. **Von Clauss A.** Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 1957; 17:237-247.
177. **Zolton RP, Mertz ET, Russell HT.** Assay of human plasminogen in plasma by affinity chromatography. *Clin Chem* 1972; 18:645-57.
178. **Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
179. **Uete T, Shimano N, Morikawa M.** Simple, sensitive method for measuring plasmin and plasminogen activity in plasma. *Clin Chem* 1975; 21:1632-7.
180. **Fickenscher K, Aab A, Stübar W.** A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991; 65:535-540.

181. **Weisel J, Veklich Y and Gorkun O.** The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J. Mol. Biol* 1993; 232:285-297.
182. **Veklich Y, Francis CW, White J, Weisel JW.** Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood* 1998; 92:4721-29.
183. **Chandler WL.** The Thromboelastograph and the Thromboelastograph technique. *Sem Throm Hemost* 1995, vol 21 (supl 4): 1-6.
184. **Pavlosky M.** Tromboelastografía. En: *Kordich L, Sánchez Ávalos JC, Vidal H, De Campos Guerra C. Manual de Hemostasia y Trombosis, grupo CLAHT, segunda edición, Buenos Aires, Argentina; 1990, pag 180-188.*
185. **Barrera L.** Tromboelastografía en *Lucía Kordich (editor en Jefe). Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de Hemostasia. Grupo CAHT. Primera edición, 2003, pag 89-92.*
186. **Traverso IT, Caprini JA, Arcelus JL.** The normal Thromboelastogram and its interpretation. *Sem Throm Hemost* 1995, vol 21 (supl 4): 7-13.
187. **Traverso IT, Caprini JA, Arcelus JL.** The normal Thromboelastogram and its interpretation. *Sem Throm Hemost* 1995, vol 21 (supl 4): 91-93.
188. **Schramm Gebhard.** A practical approach to rheology and rheometry. *Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Germany, 1994.*
189. **Marchi R, Lundberg U, de Bosh NB, Arrocha-Piñango CL.** Fibrinogen Caracas I: a dysfibrinogenemia with a hemorrhagic diathesis associated with diminished fibrin fiber diameter and reduced fibrin gel porosity. *Blood Coag Fibrinolysis* 1998; 9:733-739.
190. **Lee KN, Kenneth WJ, Christiansen VJ, Chung KH et al.** A novel plasma proteinase a2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* 2004; 103 (10): 3783-88.
191. **Scheiner T, Jirouskova M, Nagaswami C, Coller BS, Weissel W.** A monoclonal antibody to the fibrinogen  $\alpha$  chain alters fibrin clots structure and its properties by producing short, thin fibers arranged in bundles. *J Throm Haemostas* 2003; 1: 2594-2602
192. **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; 264:15104-8.
193. **Langer BG, Weisel JW, Dinauer PA, Nagaswami C, Bell WR** Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *J Biol Chem* 1988; 263:15056-63.
194. **Marchi R, Arrocha-Piñango CL, Nagy H, Matsudas M, Weisel JW.** The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen on polymerisation and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen Lima (Aa Arg141-> Ser with extra glycosylation). *J Thromb Haemost* 2004; 2: 940-8.

195. **Marchi R, Lundberg U, de Bosh NB, Arrocha-Piñango CL.** Fibrinogen Caracas I: a dysfibrinogenemia with a hemorrhagic diathesis associated with diminished fibrin fiber diameter and reduced fibrin gel porosity. *Blood Coag Fibrinolysis* 1998; 9:733-739.
196. **Nielsen VG, Geary BT, Baird MS.** Evaluation of the contribution of platelets to clot strength by thromboelastography in rabbits: the role of tissue factor and cytochalasin D. *Anesth Analg* 2000; 91(1):35-9.
197. **Marchi R, Arrocha-Piñango CL, Nagy H, Matsudas M, Weisel JW.** The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen on polymerisation and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen Lima (Aa Arg141-> Ser with extra glycosylation). *J Thromb Haemost* 2004; 2:940-8.
198. **Scheiner T, Jirouskova M, Nagaswami C, Collier BS, Weisel W.** A monoclonal antibody to the fibrinogen  $\gamma$  chain alters fibrin clots structure and its properties by producing short, thin fibers arranged in bundles. *J Thromb Haemostas* 2003; 1: 2594-2602.
199. **Scrutton MC, Ross-Murphy SB, Bennet GM, Striling I and Meade TW.** Change in clot deformability-a possible explanation for the epidemiological association between plasma fibrinogen concentration and myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5:719-23.
200. **Glover CJ, Mc Intire LV, Brown CH, Natelson EA.** Rheological properties of fibrin clots. Effect of fibrinogen concentration, factor XIII deficiency, and factor XIII inhibition. *J Lab Clin Med* 1975; 86:644-56.
201. **Ryan EA, Mochros LF, Weisel JW, Lorand L.** Structural origin of fibrin clot rheology. *Biophys J* 1999; 77:2813-26.
202. **Blom HJ.** Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26 (3):227-232.
203. **Pieters M, Jerling JC, Weisel JW.** Effect of freeze- drying and frozen storage of blood plasma on fibrin network characteristics. *Thromb Res* 2002; 107 (5):263-9.
204. **He S, Cao H, Antovic A, Blomback M.** Modifications of flow measurement to determine fibrin gel permeability and the preliminary use in research and clinical materials. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005 Jan;16(1):61-7.
205. **Carr ME, Alving BM.** Effect of fibrin structure on plasmin-mediated dissolution of plasma clots. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995; 6: 567-573.

*ABREVIATURAS*

**ABREVIATURAS**

<b>am</b>	amplitud máxima
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>ATIII</b>	Antitrombina III
<b>c.f.</b>	Concentración final
<b>C1r y C1s</b>	componente del sistema del complemento
<b>C<math>\beta</math>S</b>	Cistationín $\beta$ -sintetasa
<b>DD</b>	Dímero D
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DS</b>	Dermatán Sulfato
<b>ds</b>	desvío estándar
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EPCR</b>	Receptor Endotelial de la Proteína C
<b>Fbg</b>	Fibrinógeno
<b>FPA</b>	Fibrinopéptido A
<b>FPB</b>	Fibrinopéptido B
<b>FvW</b>	Factor von Willebrand
<b>G</b>	Módulo de Young
<b>HCII</b>	Cofactor II de la heparina
<b>Hcy</b>	Homocisteína
<b>HHcy</b>	Hiperhomocisteinemia
<b>HMWK</b>	Quininógeno de Alto peso molecular
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>HRG</b>	Glicoproteína rica en histidina
<b>kD</b>	kilo Dalton
<b>K<sub>I</sub></b>	dominio kringle I
<b>Ks</b>	Coefficiente de permeabilidad intrínseca
<b>LBS</b>	Sitios de unión a la lisina

---

<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>MTHFR</b>	Metiléntetrahidrofolato reductasa
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PAI</b>	Inhibidor del Activador del Plasminógeno
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PC</b>	Proteína C
<b>PCA</b>	Proteína C activada
<b>PDF</b>	Producto de degradación de Fbg/Fibrina
<b>Plg</b>	Plasminógeno
<b>Plm</b>	Plasmina
<b>scu-PA</b>	Activador del Plasminógeno, tipo uroquinasa de cadena simple
<b>SF</b>	Solución Fisiológica
<b>SK</b>	Estreptoquinasa
<b>TAFI</b>	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
<b>tcu-PA</b>	Activador del Plasminógeno, tipo uroquinasa de doble cadena
<b>TEG</b>	Tromboelastograma
<b>TF</b>	Factor Tisular
<b>TM</b>	Trombomodulina
<b>t-PA</b>	Activador tisular del Plasminógeno
<b>Trb</b>	Trombina
<b>UK</b>	Uroquinasa
<b>u-PA</b>	Activador del Plasminógeno, tipo uroquinasa
<b>u-PAR</b>	Receptor para el u-PA
<b><math>\alpha_2</math>-AP</b>	alfa <sub>2</sub> -antiplasmina

## ***DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS***



**PUBLICACIONES**

**Effect of Homocysteine Thiol Group on Fibrin Networks: Another Possible Mechanism of Harm.**

Lauricella AM, Quintana I, Kordich L.  
*Thrombosis Research* 2002, 107: 75-79.

**Influence of Homocysteine on Fibrin Networks Lysis.**

Ana M Lauricella, Irene L Quintana, Beatriz Sasseti, Mercedes Castañón, Lucía C Kordich  
Trabajo enviado a *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Febrero 2005.

**PRESENTACIONES A CONGRESOS**

**Efecto de la Homocisteína y Compuestos Químicamente Relacionados, en la Formación de la Red de Fibrina.**

Lauricella AM, Quintana I, Kordich L.  
XVII Congreso Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (CLAHT).  
México DF, Octubre de 2001.  
Trabajo seleccionado para premio expuesto en sesión plenaria.

**Modificación de la Red de Fibrina por Homocisteína.**

Lauricella AM, Quintana I, Castañón M, Kordich L.  
Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).  
Mar del Plata, Noviembre de 2001.  
*Medicina*, Vol. 61 N° 5/2, 2001.

**Efecto de la Homocisteína en la Lisis de Fibrina. ¿Acción Protrombótica?**

Lauricella A, Quintana I, Castañón M, Kordich L, Sasseti B..  
Congreso de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH).  
Mar del Plata. Octubre de 2003.  
Trabajo seleccionado para premio, expuesto oralmente en sesión especial.

**Características Reométricas de Geles de Fibrina Formados en Presencia de Homocisteína**

A.M. Lauricella, A.M. Rojas, I. Quintana, M.M. Castañón, B. Sasseti, L.C. Kordich.

VI Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis, Grupo CAHT.

Buenos Aires, Octubre de 2004.

Ganador del 1° Premio del Congreso.

**Efecto de la Homocisteína sobre la Permeabilidad de Geles de Fibrina.**

A.M. Lauricella, AM, Oberholzer V, Sasseti B, Kordich LC, Quintana I.

Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas (SAIC; SAI, SAFE; SAP; SAN; SAF).

Mar del Plata, Noviembre de 2004.