



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ACCIÓN DEL DERMATÁN SULFATO
SOBRE EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

María Mercedes Castañon

Director de tesis: Lucía Clelia Kordich

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Departamento de
Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de
Buenos Aires.

Buenos Aires, 2007

“La verdad en ciencia puede ser definida como la hipótesis de trabajo que mejor se ajusta para abrir el camino a la siguiente mejor ajustada”

*Konrad Zacharias Lorenz
Científico austriaco (1903-1989)
Premio Nobel de Medicina y Fisiología, 1973*

ACCIÓN DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

RESUMEN

El dermatán sulfato (DS) es un glicosaminoglicano endógeno, ampliamente conocido por su acción anticoagulante mediante interacción con el cofactor II de la heparina para potenciar la inhibición de trombina. Además, se ha sugerido que aumentaría la actividad fibrinolítica, aunque el mecanismo aún no ha sido dilucidado.

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto del dermatán sulfato de alto (DSA) y bajo peso (DSB) molecular sobre el sistema fibrinolítico.

Se observó potenciación de la activación de plasminógeno en función del aumento de la concentración de DS. En particular, el efecto del DSA sobre la activación de Glu-plasminógeno y Lys-plasminógeno por el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y urinario (u-PA) resultó de similar magnitud al efecto de fibrina sobre la activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB, a la misma concentración estudiada, fue de menor magnitud. La combinación de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) y DS no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de plasminógeno por t-PA, sugiriendo que estarían involucrados los mismos sitios de unión. Se observó que el DS no tuvo efecto apreciable sobre la actividad amidolítica de plasmina ni de u-PA y se comprobó por electroforesis (SDS-PAGE) que estaba favorecida la conversión de plasminógeno a plasmina. Los resultados obtenidos por método amidolítico, apoyan la hipótesis de que el DS tiene efecto pro-fibrinolítico mediante una acción potenciadora del proceso de activación de plasminógeno.

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la formación, estructura y lisabilidad de la red de fibrina. El efecto del DS sobre la cinética de fibrinoformación se caracterizó por aumento de la fase de latencia, disminución de la velocidad de fibrinoformación, prolongación del tiempo de coagulación y disminución de la densidad óptica máxima. Estos geles resultaron más fácilmente compactables, indicando que la red estaría constituida por fibras más frágiles, separadas por compartimientos líquidos más grandes. Por microscopía electrónica se observó que las redes formadas en presencia de DS presentaron una arquitectura más abierta, con igual densidad de fibras, más largas y delgadas que las fibras control. Estas redes resultaron más rápidamente lisadas que las

redes control. Por lo tanto, el DS no sólo actúa como regulador de la actividad de trombina, sino además actuaría como modulador de la estructura de la fibrina y su lisabilidad.

Se observó disminución del tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida y del tiempo de lisis de euglobulinas en función del aumento ex vivo de la concentración de DS. Se descartó el efecto anticoagulante del DS en el ensayo de euglobulinas, por lo tanto se concluye que el efecto pro-fibrinolítico observado se debería a un efecto sobre la activación del sistema fibrinolítico, en concordancia con los resultados obtenidos por método amidolítico.

En cultivo de células endoteliales 1G11, no se observaron efectos significativos del DSA sobre los niveles intracelulares ni la liberación de t-PA y PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno).

Los resultados de esta tesis demuestran que el DS tiene efecto pro-fibrinolítico y contribuyen al esclarecimiento del mecanismo de acción de este glicosaminoglicano sobre el sistema plasminógeno-plasmina. Además, permiten plantear hipótesis sobre el rol fisiológico del DS.

Palabras claves: dermatán sulfato, activación de plasminógeno, t-PA, u-PA, red de fibrina, estructura, lisabilidad.

DERMATAN SULFATE ACTION ON THE FIBRINOLYTIC SYSTEM

ABSTRACT

Dermatan sulfate (DS) is well-known for its anticoagulant activity through binding to heparin cofactor II to enhance antithrombin action. It has also been suggested that DS has a profibrinolytic effect, although the exact molecular mechanism is as yet unknown.

The aim of this thesis was to evaluate dermatan sulfate (high and low molecular weight) action on the fibrinolytic system.

An *in vitro* amidolytic method was used to study the effect of high and low molecular weight-DS on the activation of Glu and Lys-plasminogen by tissue and urinary plasminogen activators (t-PA and u-PA). Both, high and low molecular weight-DS exhibited a stimulating effect on the activation of plasminogen by PAs. Interestingly, high molecular weight-DS stimulated Glu and Lys-plasminogen activation by t-PA and u-PA in a way and to an extent similar to that in which fibrin(ogen) degradation products (PDF) increased the t-PA assay. Meanwhile low molecular weight-DS had a lower effect. No DS had any effect on plasmin or u-PA amidolytic activity. The facilitation of the conversion of Glu-plasminogen to plasmin in the presence of DS was confirmed by SDS-PAGE; high molecular weight-DS effect was greater than low molecular weight-DS in accordance with the chromogenic assays. Moreover, the combination of PDF and high and low molecular weight-DS, respectively, did not further stimulate t-PA activation of either Glu or Lys-plasminogen suggesting that both substances may compete for the same binding sites. Through *in vitro* assays we demonstrated that high and low molecular weight-DS enhance plasminogen activation by u-PA and t-PA, suggesting that the profibrinolytic activity of DS might be via potentiation of plasminogen conversion to plasmin.

By fibrin formation kinetic studies, DS prolonged lag phase and coagulation time and decreased velocity and optical density. DS-fibrin networks were more porous made of less resistant to centrifugal force fibers (compactation studies). The networks displayed equal fiber density, which were longer and thinner than controls (electron microscopy) and showed shorter lysis time. Therefore, DS would act not only as a thrombin activity regulator, but as a fibrin structure and lysis modulator.

Blood diluted clot lysis time and euglobulin lysis time were shorter in the presence of DS. Since, it was discarded the anticoagulant DS effect in the euglobulin assay, we conclude

that DS has a pro-fibrinolytic effect mediated by fibrinolytic activation. These results confirm the previous obtained by amidolytic method.

DS action on endothelial 1G11 cells was evaluated by measuring t-PA and PAI levels, and no significant differences were observed.

Our results demonstrate that DS has a pro-fibrinolytic effect and contribute to clarify the mechanism of action of this glycosaminoglycan on the plasminogen-plasmin system.

Key words: dermatan sulfate, plasminogen activation, t-PA, u-PA, fibrin network, structure, lisability.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Lucía Kordich, mi directora de tesis, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación. Para mi es un honor haber sido su tesista y considero que poner en palabras todo lo que he aprendido a su lado sería minimizarlo. Espero, sepa comprender a través de estas pocas palabras mi sincero *gracias...*

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

El sistema hemostático	21
Sistema de coagulación	22
Formación de fibrina	27

Sistema fibrinolítico

Plasminógeno	31
Plasmina	34

Activadores del sistema fibrinolítico

Activador tisular del plasminógeno (t-PA)	37
Mecanismo de activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrin(ogeno)	39
Activador del plasminógeno de tipo urinario (u-PA)	41
Activadores exógenos del plasminógeno	43

Inhibidores del sistema fibrinolítico

Inhibidores de los activadores del plasminógeno	46
Inhibidores de plasmina	48
Inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI)	50

Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos en hemostasia	56
Trombina-Antitrombina III-Heparán sulfato y Heparina	57
Trombina-Cofactor II de la heparina-Dermatán sulfato	60
Dermatán sulfato como droga antitrombótica	61
Dermatán sulfato como droga antitrombótica y pro-fibrinolítica	62

OBJETIVOS

67

MATERIALES y MÉTODOS

Muestras

71

Sangre en citrato de sodio

Plasma en citrato de sodio	
Fracción plasmática de Euglobulinas	
Dermatán sulfato y otros reactivos	73
Dermatán Sulfato puro o de alto peso molecular (DSA)	
Dermatán Sulfato de bajo peso molecular (DSB)	
Otros reactivos comerciales	
Técnicas generales de laboratorio	75
Técnica de Outcherlony	
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE y SDS-PAGE-Urea)	
Determinación de proteínas por el método de Lowry	
Determinación de Plasminógeno	
Determinación de Fibrinógeno	
Determinación de Antitrombina III	
Determinación de Cofactor II de la heparina	
Determinación de Productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF)	
Determinación de Dímero D	
Purificación y caracterización de plasminógeno	81
Preparación de lisina-sefarosa	
Técnica de purificación por cromatografía de afinidad	
Purificación de plasminógeno humano plasmático	
Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de componentes del sistema fibrinolítico	
Los sustratos cromogénicos	86
Mecanismo de acción de serino-proteasas sobre sustratos cromogénicos	89
Diseño y optimización de un método amidolítico-cinético para evaluar actividad de componentes del sistema fibrinolítico	
A.- Estudio de la activación de plasminógeno	91
A ₀ .- Optimización de condiciones experimentales generales	91
A ₁ .- Activación de plasminógeno por u-PA	97

A ₂ - Activación de plasminógeno por t-PA	99
Preparación y caracterización de un producto estimulador de t-PA soluble	
A ₃ - Activación de plasminógeno por estreptoquinasa	109
B.- Determinación de actividad amidolítica de plasmina	111
C.- Determinación de actividad amidolítica de u-PA	112
D.- Análisis de los resultados	116
Método amidolítico para estudiar la reacción de activación de plasminógeno	
Método amidolítico para estudiar la actividad de plasmina	
Método amidolítico para estudiar la actividad de uroquinasa	
Preparación y caracterización de Lys-plasminógeno	123
Preparación de Lys-plasminógeno	
Caracterización de Lys-plasminógeno por método amidolítico	
Caracterización de Lys-plasminógeno por método electroforético	
Efecto del dermatán sulfato sobre el ensayo de activación de Lys-plasminógeno	
Análisis de los resultados	
Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la formación y estructura de redes de fibrina	
Formación de redes de fibrina	130
Ensayo de fibrinoformación por recalcificación	
Ensayo de fibrinoformación por agregado de trombina	
Análisis de los resultados	
Estructura de redes de fibrina	134
Ensayo de compactación de redes de fibrina	
Imágenes de la red de fibrina por microscopía electrónica	
Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la lisabilidad de redes de fibrina	
Ensayo de coagulación y fibrinólisis en dos etapas	139
Descripción de la técnica y optimización de las condiciones experimentales	
Análisis de los resultados	
Tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida	141
Técnica original	

Efecto del dermatán sulfato <i>ex vivo</i> sobre el y tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida	
Tiempo de lisis de euglobulinas	143
Técnica original	
Efecto del dermatán sulfato <i>ex vivo</i> sobre el tiempo de lisis de euglobulinas	
A.- Efecto del dermatán sulfato sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar	
B.- Efecto del dermatán sulfato sobre la precipitación y el tiempo de lisis de euglobulinas	
Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial	150
Cultivos celulares	
Determinación de t-PA y PAI-1	

RESULTADOS

Estudio del efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de componentes del sistema fibrinolítico

Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno	157
Efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de plasmina	169
Efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de los activadores del plasminógeno	173
Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-plasminógeno	177
Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno por estreptoquinasa	183
Discusión general	191

Estudio del efecto del dermatán sulfato sobre la formación, estructura y lisabilidad de redes de fibrina

Efecto del dermatán sulfato sobre la formación de redes de fibrina	199
Efecto del dermatán sulfato sobre la estructura de redes de fibrina	209
Efecto del dermatán sulfato sobre la lisabilidad de redes de fibrina	215
Discusión general	243
Efecto del dermatán sulfato sobre la formación, estructura y lisabilidad de redes de fibrina plasmática	
Efecto del dermatán sulfato sobre el tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida y el tiempo de lisis de euglobulinas	

Estudio del efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial	
Efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial	255
Discusión	257
<u>CONCLUSIONES</u>	263
<u>ABREVIATURAS</u>	273
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	279
<u>DIFUSIÓN de RESULTADOS</u>	295

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El sistema hemostático engloba al conjunto de mecanismos y factores que permiten que la sangre circule fluidamente a través de los vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas, pero que ante una injuria vascular son los responsables de evitar la pérdida de sangre obturando el sitio de la injuria y de reconstituir el endotelio recuperando la luz del vaso. Todos los componentes involucrados, vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas del sistema de coagulación, sistema fibrinolítico y otros sistemas enzimáticos plasmáticos, están en un equilibrio dinámico regulado estrictamente por diversas interacciones moleculares específicas.

El **endotelio vascular** normal participa en la función de mantener la fluidez de la sangre a través de diversos mecanismos: produciendo inhibidores de la coagulación, produciendo inhibidores de la agregación plaquetaria, modulando la fibrinólisis y regulando el tono y la permeabilidad vascular.

Cuando el endotelio vascular se daña y pierde sus propiedades anticoagulantes y antiagregantes naturales, se promueven diversos procesos fisiológicos, entre ellos la agregación plaquetaria y la activación del sistema de coagulación, provocando la formación de trombos no deseados ⁽¹⁾.

La participación de las **plaquetas** en el sistema hemostático involucra reacciones de adhesión a la superficie subendotelial expuesta post-injuria, secreción de componentes intraplaquetarios y formación de agregados. Además, la membrana plaquetaria participa en la adsorción y concentración de factores de coagulación, promoviendo y acelerando la activación del sistema de coagulación. El resultado final de la activación del sistema de coagulación es la formación de la red de fibrina, que junto con las plaquetas y las otras células plasmáticas circulantes forman el coágulo que refuerza la acción del tapón plaquetario ⁽²⁾.

El **sistema de coagulación** involucra una serie de reacciones secuenciales en las cuales proenzimas plasmáticas o zimógenos de serinoproteasas son transformados en enzimas activas, y procofactores son transformados en cofactores. La naturaleza secuencial de estas reacciones, amplifica el proceso global, denominado cascada de coagulación, cuyo evento final es la formación de trombina, la enzima que convierte el fibrinógeno plasmático soluble en fibrina, un polímero insoluble que forma el coágulo.

Durante la formación del tapón hemostático, se inician simultáneamente mecanismos bioquímicos regulatorios destinados a limitar la extensión del proceso de coagulación y reestablecer el flujo sanguíneo normal. Este fenómeno involucra la acción de los *inhibidores fisiológicos de la coagulación* y la activación localizada del *sistema fibrinolítico*, también llamado *sistema plasminógeno-plasmina*. La función del sistema fibrinolítico, es degradar el coágulo formado para restablecer el flujo sanguíneo. Este mecanismo está altamente regulado para permitir la reparación de la lesión vascular sin comprometer la estabilidad del coágulo de manera temprana y para limitar la activación de plasminógeno al área de la injuria. La regulación del proceso de coagulación y fibrinólisis es dinámica, involucrando el equilibrio entre sustancias pro y anticoagulantes y pro y antifibrinolíticas.

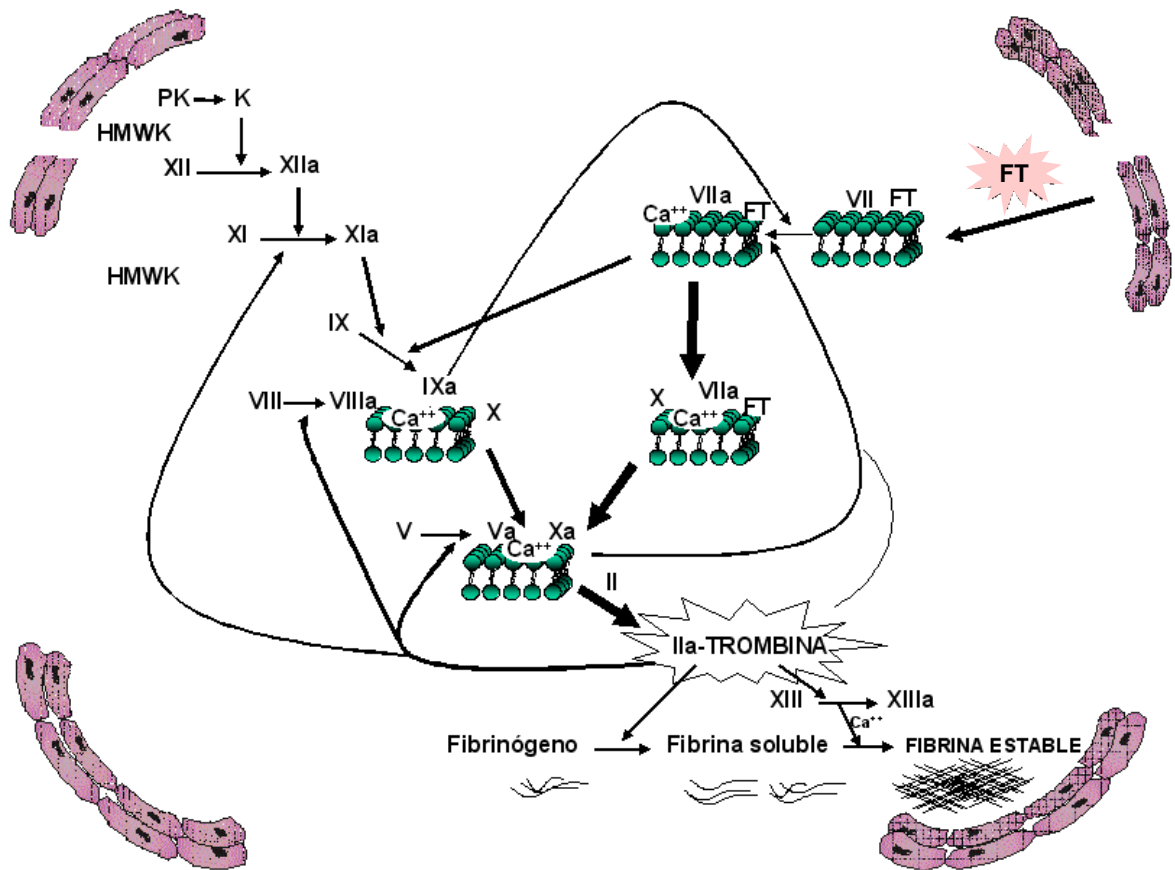
A continuación se presenta una breve descripción sobre el sistema de coagulación, para introducir algunos conceptos relacionados con el trabajo de esta tesis, y se desarrollan más profundamente conceptos relacionados con la formación de fibrina y el sistema fibrinolítico.

SISTEMA DE COAGULACIÓN

Si bien tradicionalmente el sistema de coagulación ha sido dividido en dos vías de activación (vía extrínseca y vía intrínseca, de gran utilidad para interpretar los ensayos de laboratorio), esta división no ocurre *in vivo* y actualmente el sistema de coagulación se presenta como una cascada unificada⁽³⁻⁵⁾.

Se considera que el factor tisular (FT), una proteína integral de membrana que se expresa constitutivamente en células que no están en contacto con el torrente sanguíneo, es el principal iniciador de la coagulación *in vivo*. Esta proteína es encargada de iniciar la coagulación ya sea a través de la exposición post-injuria vascular de células ricas en FT (fibroblastos) o por expresión en células activadas (célula endotelial o monocitos estimulados por citoquinas, trombina o endotoxinas). El FT une factor VII circulante para formar un complejo FT-VII, y debido a que aproximadamente el 1 % del factor VII circulante está activado (VIIa), la formación del complejo FT-VIIa enzimáticamente activo, auto-cataliza la activación de FT-VII.

El complejo FT-VIIa, formado sobre la superficie celular de fibroblastos o monocitos y células endoteliales activados, tiene dos sustratos principales: el factor IX y el factor X.



Esquema de activación del sistema de coagulación.

Trombina (IIa), factor tisular (FT), pre-caliceína (PK), caliceína (K), quinínogenos de alto peso molecular (HMWK), iones calcio (Ca⁺⁺), célula endotelial (en rosa), membrana fosfolipídica (en verde).

Los factores IX y X son proteínas vitamina K dependientes, como el factor II o protrombina, factor VII y las proteínas C, S y Z. Estas proteínas poseen residuos γ -carboxilados (residuos GLA) en la porción amino Terminal (N-terminal), los cuales para su correcta síntesis en el hepatocito requieren de un sistema acoplado al ciclo de óxido-reducción de la vitamina K. Esta modificación *post-transcripcional* de la proteína es esencial para la interacción con iones calcio; un ión calcio con dos grupos carboxilo del residuo GLA, actúan como puente para que la proteína se una a las superficies fosfolipídicas celulares.

Una vez formadas las serinoproteasas activas IXa y Xa permanecen unidas a membranas celulares a través de sus residuos GLA y catalizan nuevas reacciones de activación. El factor IXa activa al factor X y el factor Xa cataliza la conversión de protrombina a trombina, aunque inicialmente ambas reacciones son muy lentas.

Sin embargo, estas pequeñas cantidades de trombina inicialmente formada son capaces de promover la activación de los cofactores V y VIII, los que favorecen la acción del factor

Xa sobre la protrombina y del factor IXa sobre el factor X respectivamente, promoviendo la amplificación de la generación de trombina.

El factor VIII circula en plasma unido al factor von Willebrand (vW), que se une a las plaquetas a través de la glicoproteína Ib-V-IX acercando al factor VIII al sitio de la injuria. El factor VIII, luego de disociarse del factor vW, es activado por Xa o trombina y forma un complejo de activación sobre las superficies fosfolípídicas de células activadas junto con el factor IXa e iones calcio (Ca^{++}) llamado tenasa (VIIIa-IXa-fosfolípidos y Ca^{++}). La activación de factor X a través del complejo tenasa es 50 veces más eficiente que la que se lleva a cabo por el FT-VIIa, resultando el principal activador del factor X.

De modo análogo, el cofactor Va junto al factor Xa forman un complejo sobre las superficies fosfolípídicas celulares junto con iones Ca^{++} , llamado protrombinasa, responsable de la formación de trombina con una eficiencia 300.000 veces mayor.

Por otro lado, la trombina generada por el complejo protrombinasa es capaz de activar al factor XI que, en presencia de iones Ca^{++} , contribuye a la propagación del proceso de coagulación por la formación de grandes cantidades de trombina a través de la activación de factor IX.

En la generación de factor XIa también intervienen las denominadas proteínas de fase de contacto. Entre ellas se encuentran el factor XII y la precalicreína (PK) que son precursores de serinoproteasas, y los quinínógenos de alto peso molecular (HMWK) que son cofactores no enzimáticos. Si bien la participación del sistema de contacto en la iniciación de la coagulación es poco relevante, estas proteínas intervienen en la iniciación de la respuesta inflamatoria, la activación de complemento, activación de la fibrinólisis, activación de metaloproteasas y angiogénesis.

La regulación de la cascada de coagulación se produce principalmente por tres mecanismos:

- a) inhibición del complejo FT-VIIa y factor Xa por acción del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)
- b) inactivación de los cofactores Va y VIIIa por acción del sistema de la PC
- c) inhibición directa de trombina y otras serinoproteasas por acción de antitrombina III (AT III), cofactor II de la heparina (CH II), C₁-inhibidor, α_1 -antitripsina (α_1 -AT), α_2 -macroglobulina (α_2 -MG) e inhibidor dependiente de proteína Z (ZPI).

El TFPI es una proteína sintetizada por la célula endotelial que inhibe al factor Xa en forma directa y al complejo FT-VIIa a través de la formación de un complejo cuaternario (TFPI-Xa-FT-VIIa), regulando la iniciación de la coagulación.

El mecanismo de inhibición mediado por la PC (sistema de la proteína C), involucra la acción de varios componentes: la PC, la proteína S (PS), el receptor de PC en célula endotelial (EPCR), la trombomodulina (TM) y el factor V.

La activación eficiente de PC requiere de la presencia en la superficie endotelial del receptor EPCR, que aumenta la afinidad del complejo trombina-TM por la PC. La PC activada proteolíticamente por acción de trombina (PCa) se libera de su receptor y en presencia de la PS y factor V tiene la capacidad de inactivar por proteólisis parcial a los cofactores Va y VIII, regulando la generación de trombina.

La AT III es el principal inhibidor de la cascada de coagulación. Es una anti serinoproteasa (serpina) de amplio espectro con capacidad de inhibir trombina, y además factor Xa, XIa, IXa y calicreína, formando un complejo covalente inactivo (serinoproteasa/inhibidor), que es depurado rápidamente de circulación.

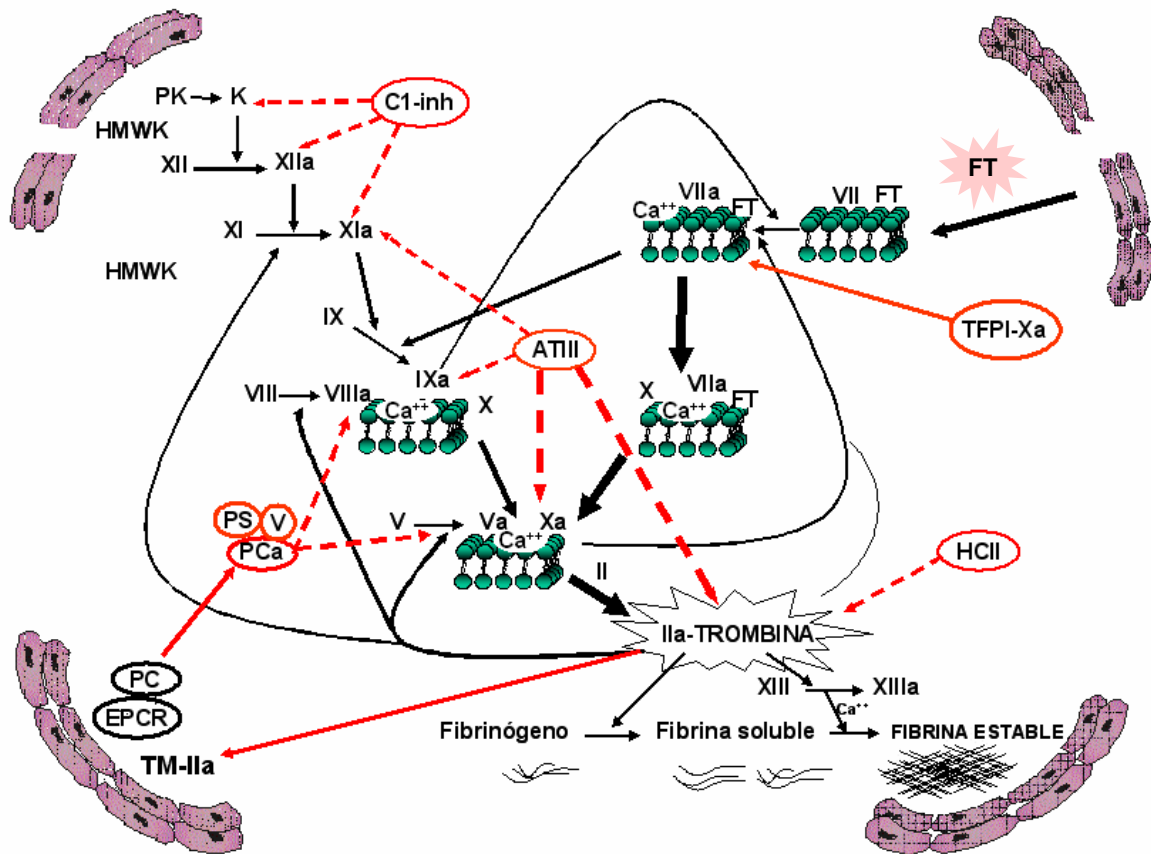
El CH II es una serpina con acción específica sobre trombina, actualmente considerado el principal inhibidor de trombina extravascular.

El C₁-inhibidor inhibe principalmente las enzimas de la fase de contacto.

La α_1 -AT inhibe calicreína, factor XIa y trombina.

El ZPI inhibe los factores XIa y Xa (la inhibición de factor Xa depende de la presencia de proteína Z, fosfolípidos y calcio).

La α_2 -MG es un inhibidor de amplio espectro que forma complejos en los que la enzima (principalmente trombina y calicreína) queda atrapada conservando parcialmente su actividad, pudiendo actuar como un sistema de reposición de actividad enzimática.



Esquema de regulación del sistema de coagulación.

Se indican los principales inhibidores fisiológicos: antitrombina III (AT III), cofactor II de la heparina (CH II), C1 inhibidor (C1-inh), inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y sistema de la proteína C (trombomodulina (TM), proteína C (PC), proteína S (PS), proteína C activada (PCa), receptor de proteína C en célula endotelial (EPCR)).

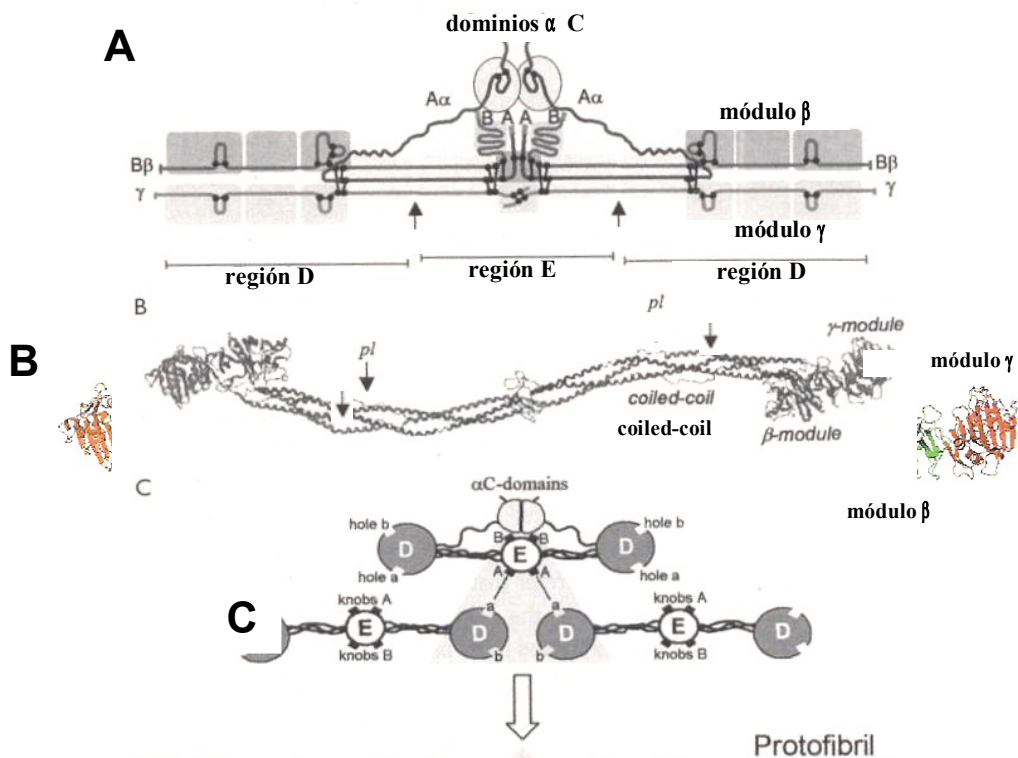
Trombina (IIa), factor tisular (FT), pre-caliceína (PK), caliceína (K), quinínógenos de alto peso molecular (HMWK), iones calcio (Ca^{++}), célula endotelial (en rosa), membrana fosfolipídica (en verde).

La trombina ocupa un rol central en el proceso de formación del tapón hemostático. A través de la activación de los cofactores VIII y V y del factor XI, produce un aumento de la generación de los complejos tenasa y protrombinasa, amplificando su propia generación para dar lugar a la formación de fibrina por acción sobre su principal sustrato, el fibrinógeno. Por otro lado, si bien su generación está regulada por la acción de inhibidores fisiológicos, la trombina a través de su unión a TM sobre la superficie endotelial, cambia su especificidad de sustrato perdiendo su capacidad de clivar al fibrinógeno y activar a los cofactores V y VIII, e inicia un mecanismo de retroalimentación negativa activando a la proteína C (PC). Además, la trombina es responsable de la activación del factor XIII favoreciendo la estabilización de la red de fibrina y del inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI), interviniendo en la regulación de la fibrinólisis.

FORMACIÓN DE FIBRINA

El fibrinógeno es una glicoproteína de síntesis hepática formada por dos heterodímeros idénticos unidos por puentes disulfuro, cada uno formado por tres tipos de cadenas polipeptídicas $A\alpha$, $B\beta$ y γ .

La molécula de fibrinógeno presenta por microscopía electrónica una arquitectura trinodular, un nódulo central y dos externos conectados por una delgada cadena lineal ^(6,7).



Esquema de la molécula de fibrinógeno

A: Diagrama de las seis cadenas polipeptídicas de la molécula de fibrinógeno ($A\alpha$, $B\beta$ y γ). Se señalan las regiones correspondientes a los dominios D y E.

B: Diagrama de la estructura cristalográfica de la molécula de fibrinógeno de pollo (Yang Z, Kollman JM, Pandi L, et al. *Cristal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution*. *Biochemistry* 2001; 40: 12515). Se destaca la ausencia del largo segmento carboxi-terminal de la cadena $A\alpha$ que se dobla sobre si mismo, característico del fibrinógeno humano. (en azul, verde y rojo se señalan las cadenas α , β y γ).

C: Esquema simplificado de la molécula de fibrinógeno donde se señalan los dominios D y E.

El nódulo central, llamado dominio E, está formado por los seis extremos N-terminal de las cadenas $A\alpha$, $B\beta$ y γ unidos por puentes disulfuro. Los nódulos externos, llamados dominios D, están formados por los extremos carboxi-terminales (C-terminal) de las cadenas $B\beta$ y γ y una porción de la cadena $A\alpha$ y, están localizados en forma diagonalmente opuesta respecto del eje longitudinal de la molécula. Los dominios D y E están unidos a

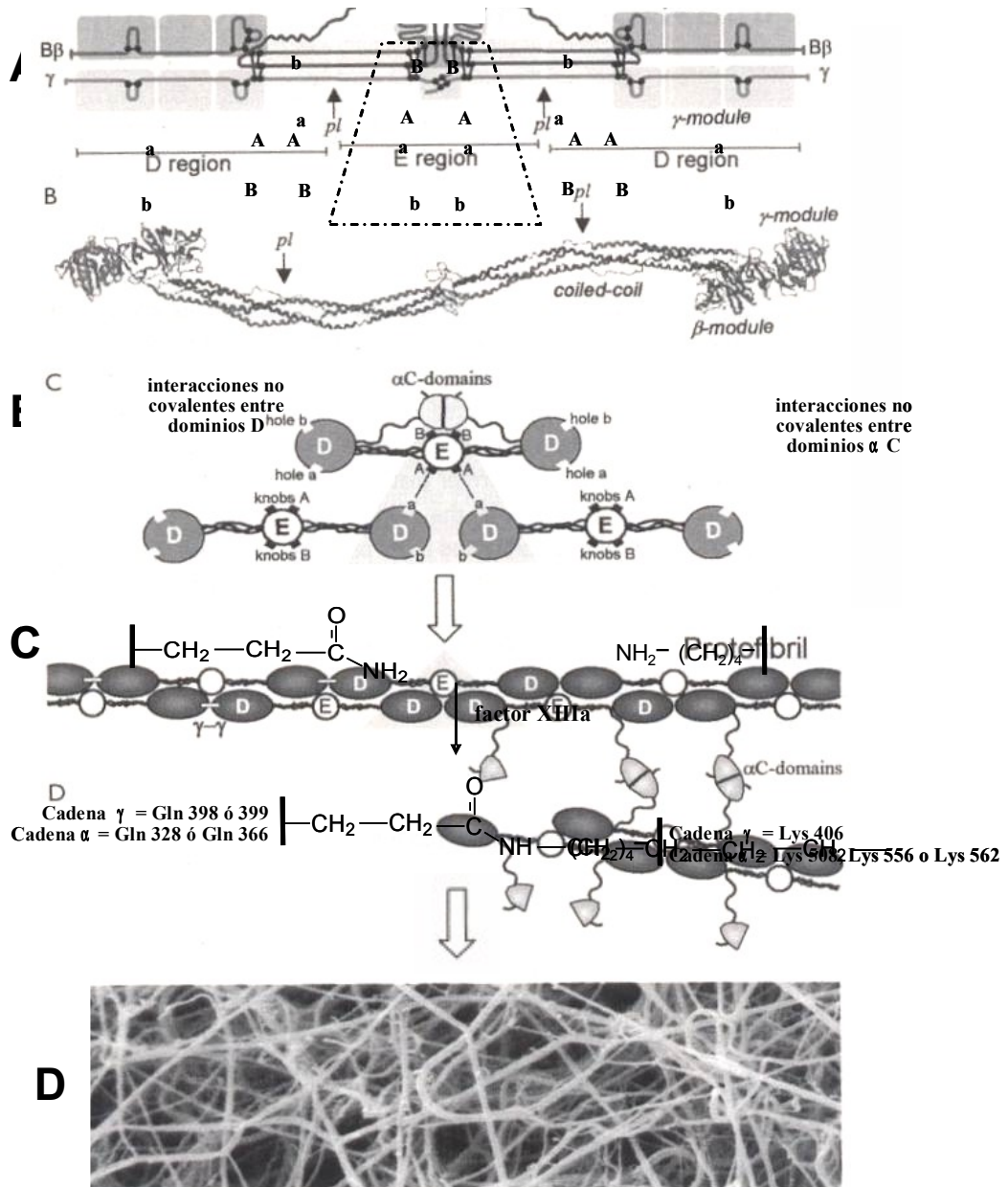
través de los segmentos centrales de las tres cadenas polipeptídicas que forman una α -hélice conocida como región “*coiled-coil*”, limitada por dos anillos disulfuro.

La conversión de fibrinógeno soluble en una red de fibrina insoluble ocurre en tres etapas: a) clivaje de los fibrinopéptidos A y B por acción de trombina, dando lugar a la formación de monómeros de fibrina, b) polimerización de la fibrina y c) estabilización covalente de la red de fibrina por acción de factor XIIIa.

Inicialmente la trombina se une al dominio central del fibrinógeno y cliva enlaces específicos de las cadenas $A\alpha$ ($\text{Arg}_{16}\text{--Gly}_{17}$) y $B\beta$ ($\text{Arg}_{14}\text{--Gly}_{15}$), liberando los fibrinopéptidos A y B. Si bien la liberación de fibrinopéptido B comienza lentamente y su velocidad aumenta durante la etapa de polimerización, ambas reacciones ocurren simultáneamente ⁽⁸⁾ y dan lugar a la formación de monómeros de fibrina.

Durante la liberación de fibrinopéptidos A y B se exponen sitios de unión en el dominio central E, prominencias A y B (A y B *knobs*), que pueden formar asociaciones no covalentes con sitios complementarios, concavidades a y b (a y b *holes*), presentes en los dominios D (cadenas γ y β respectivamente) de dos monómeros de fibrina adyacentes, para formar un trímero. Sucesivas interacciones A-a y B-b entre nuevos monómeros dan lugar a la formación de un largo polímero de fibrina de dos cadenas, llamado protofibrina, estabilizado por nuevas interacciones no covalentes entre dos dominio D de monómeros laterales. Además, durante la reacción de polimerización los dominios C-terminal de las cadenas α se disocian y reasocian intermolecularmente, formando nuevas interacciones no covalentes que promueven la agregación lateral de protofibras y la formación de una red de fibrina tridimensional soluble ⁽⁹⁾.

La fase final de la formación de fibrina involucra la generación de uniones covalentes entre los distintos monómeros de fibrina, mediadas por el factor XIIIa ⁽¹⁰⁾. El factor XIII es un tetrámero formado por dos pares de cadenas unidas no covalentemente (A_2B_2), las cadenas A contienen el sitio activo cisteína y las cadenas B cumplen funciones de transporte y regulación. El factor XIIIa, activado por trombina, es una transglutaminasa dependiente de calcio, que cataliza la formación de enlaces amida entre residuos lisina y glutamina de dos cadenas γ , dos cadenas α o cadenas γ y α de distintos monómeros de fibrina, en un proceso que conduce a la formación de una red estable e insoluble, mecánicamente más fuerte y resistente a la lisis química o enzimática.



Formación de fibrina.

A: Exposición de sitios de unión inter-monómeros (prominencias A y B y concavidades a y b) post liberación de fibrinopéptidos A y B y formación de un trimero. No se dibujan los dominios α C para facilitar la observación de las uniones.

B: Formación de protofibras (interacciones Aa y Bb e interacciones entre dominios D) y polimerización de la red por enlaces no covalentes entre dominios α C de protofibras adyacentes.

C: Estabilización de la red de fibrina por acción del factor XIIIa.

D: Microscopía electrónica de una red de fibrina.

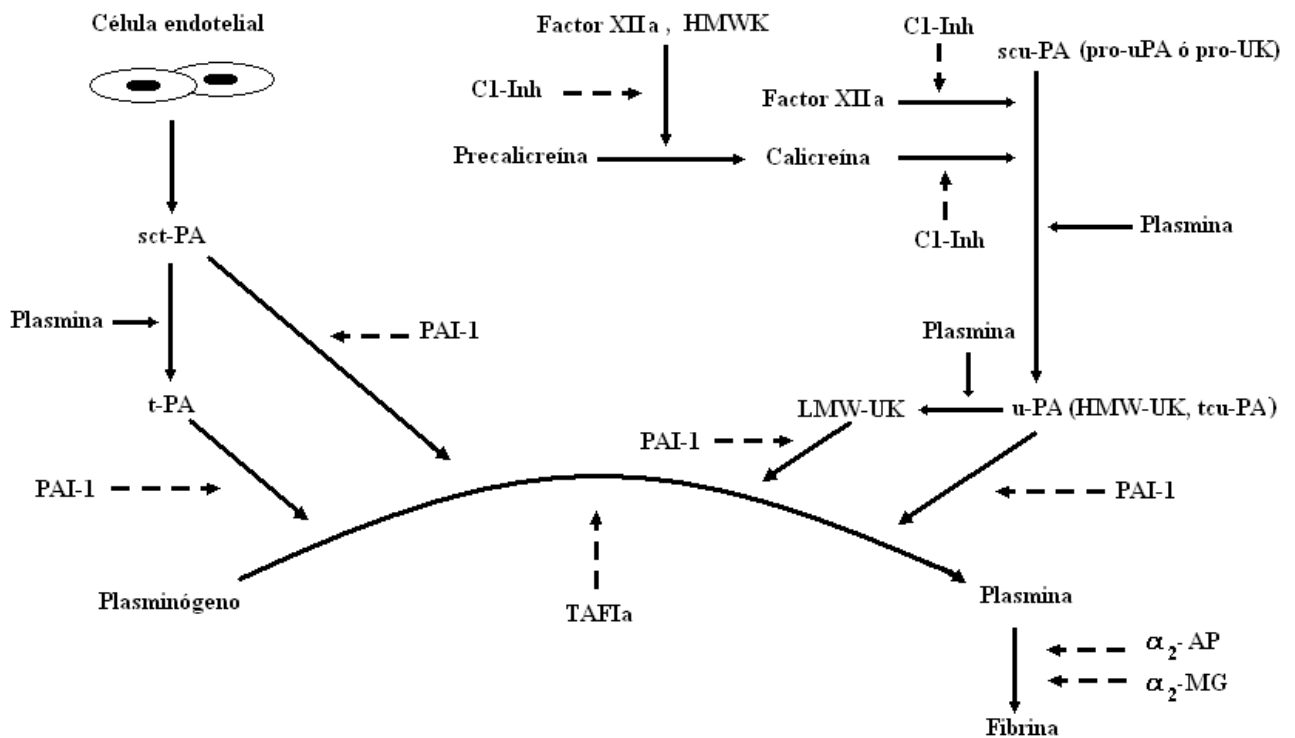
En la etapa inicial de la estabilización de la red, el entrecruzamiento ocurre principalmente por enlaces entre cadenas γ , entre dos monómeros alineados longitudinalmente o dos monómeros de hileras diferentes alineados transversalmente ^(11, 12), mientras que la interacción entre cadenas α ocurre lentamente, da lugar a la formación de grandes

oligómeros y sería crítica para la resistencia de la red a la lisis. Los enlaces entre cadenas α y γ son minoritarios.

El factor XIIIa también contribuye a la estabilización de la red entrecruzando covalentemente α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 2 (PAI-2) y el inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI), a las cadenas α de la fibrina. Detalles relacionados con estas interacciones se describen ampliamente en la sección sistema fibrinolítico.

SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Durante la activación del sistema de coagulación, se inician mecanismos bioquímicos para limitar la extensión del proceso de coagulación y reestablecer el flujo normal de la sangre. En gran medida esta última función está mediada por la activación localizada del sistema fibrinolítico ⁽¹³⁻¹⁵⁾.



Esquema del sistema fibrinolítico

Se indican los principales componentes del sistema fibrinolítico, las principales vías de activación (líneas llenas) e inhibición (líneas punteadas).

t-PA: activador tisular del plasminógeno, **sct-PA:** de simple cadena, **tct-PA:** de doble cadena.

u-PA: activador de plasminógeno de tipo urinario, **scu-PA:** de simple cadena o pro-uroquinasa (pro-UK), **tct-PA:** de doble cadena, **HMW-UK:** de alto peso molecular, **LMW-UK:** de bajo peso molecular.

PAI: inhibidor del activador del plasminógeno. **C1-Inh:** C1-inhibidor.

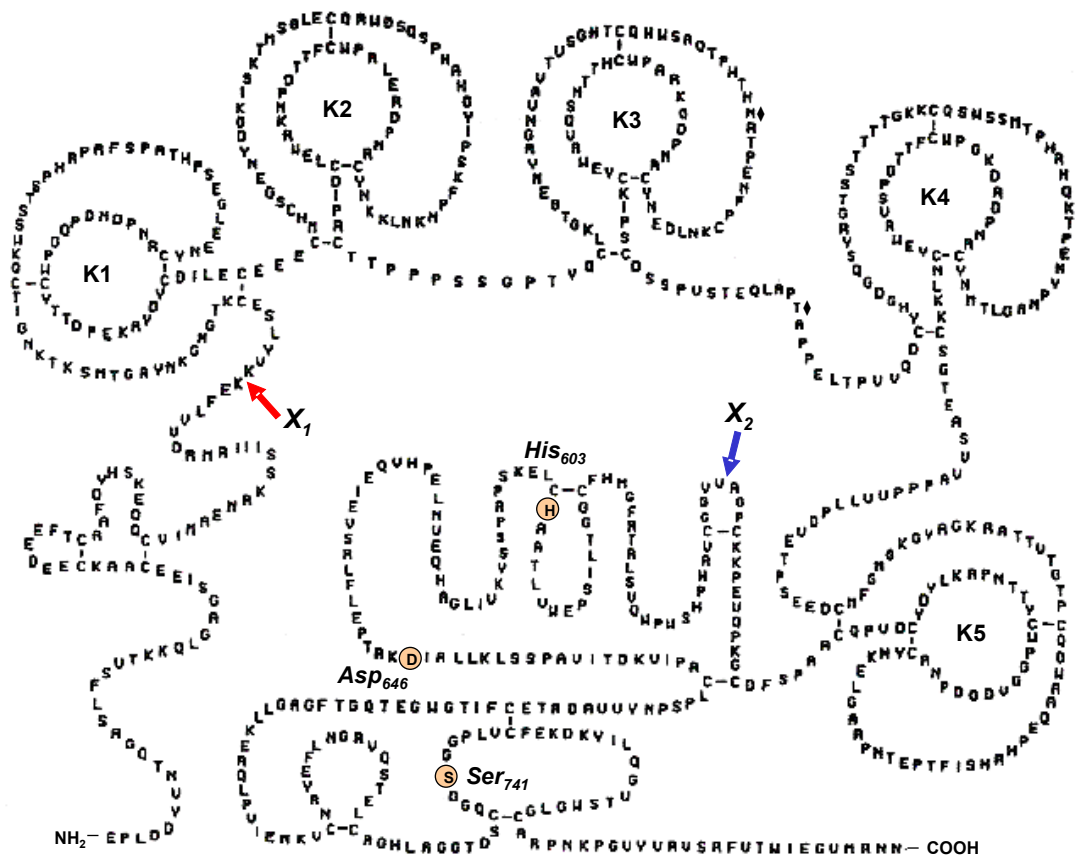
La plasmina (Plm) es la enzima activa responsable de la degradación de fibrina y, consecuentemente, de la lisis del coágulo. Esta serinoproteasa se genera por activación del zimógeno plasmático, plasminógeno (Plg), por acción de los activadores de plasminógeno. Los dos principales activadores de plasminógeno en circulación son el activador de plasminógeno de tipo tisular o t-PA y el de tipo urinario o u-PA, pertenecientes a la familia de las serinoproteasas. Además, el sistema fibrinolítico está altamente regulado por inhibidores que pertenecen a la familia de inhibidores de serinoproteasas (serpinas), los inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAIs), y el inhibidor directo de plasmina, α_2 -antiplasmina (α_2 -AP). Si bien estos son los constituyentes principales involucrados en la lisis del coágulo, el sistema fibrinolítico es complejo y participan en la función global otros zimógenos, proteasas, inhibidores, cofactores, moduladores y receptores que, a través de un delicado equilibrio, permiten limitar la activación de plasminógeno al sitio de la injuria.

El Plasminógeno es una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular determinado por secuenciación aminoacídica de 92 kDa, se sintetiza en hígado, su concentración plasmática es 200 $\mu\text{g/ml}$ (2 μM) y su vida media 2,2 días. Si bien los niveles plasmáticos de Plg son estables y la regulación del sistema fibrinolítico se produce principalmente por regulación de la expresión de los activadores de Plg y sus inhibidores, se encuentran niveles elevados de Plg durante una reacción de fase aguda.

La molécula de plasminógeno presenta una región N-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos, seguidos de cinco *kringles* (numerados 1 a 5 desde el extremo N-terminal), una zona de activación que contiene el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ que es clivado por los activadores de Plg, originando Plm y en el extremo C-terminal el dominio serinoproteasa que contiene el sitio activo formado por la tríada catalítica His₆₀₃-Asp₆₄₆-Ser₇₄₁.

Los dominios *kringles* tienen aproximadamente 80 aminoácidos de longitud cada uno y se forman debido a 3 enlaces disulfuro entre 6 residuos cisteína en posiciones conservadas (por ejemplo Cys 1, 22, 51, 63, 75 y 80 en *kringle* 5; Cys 1, 22, 50, 74, 80 en *kringle* 1, etc. Ver en esquema de la molécula de Plg) ⁽¹⁶⁾. Funcionalmente, otorgan al Plg la capacidad de unirse a residuos lisina expuestos en la fibrina, α_2 -AP, tetranectina, glicoproteína rica en histidina (HRGP), colágeno, quinínogenos de alto y bajo peso molecular (HMWK y LMWK), trombospondina y receptores en superficies celulares como anexina II y α -

enolasa. Estas interacciones modulan la activación de Plg y permiten localizar la actividad de Plm sobre el coágulo y la superficie celular.



Esquema de la molécula de Plasminógeno

K (1 a 5): kringles 1 a 5. Existe una unión inter-kringles entre Cys₄₃ del kringle 3 y Cys₄ en kringle 2 que restringe la movilidad entre ambos dominios, no dibujada en estos esquemas.

X₁ (Lys₇₇-Lys₇₈): enlace clivado por Plm originando Lys-Plg.

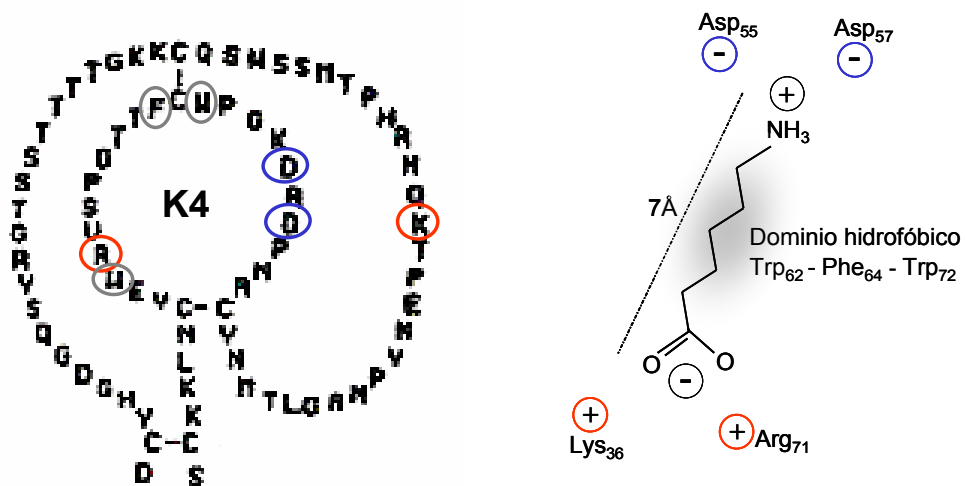
X₂ (Arg₅₆₁-Val₅₆₂): enlace clivado por los activadores de Plg para originar Plm.

Dominio serinoproteasa (Val₅₆₂-Asn₇₉₁): contiene la triada catalítica Asp, His, Ser que se expone durante la activación de Plg a Plm.

♦ **puntos de glicosilación:** N-glicosilación en Asn₂₈₉ (residuo de carbohidrato tipo manosa de 10 a 11 unidades de monosacáridos) y O-glicosilación en Thr₃₄₆ (residuo de carbohidrato de 3 ó 4 unidades sacáridas). Naturalmente existen dos variantes de Glu-Plg: Plg 1 diglicosilado en posición Asn₂₈₉ y Thr₃₄₆ y Plg 2 monoglicosilado en la posición Thr₃₄₆.

Los dominios *kringles* presentan sitios de unión a lisina (*lysine binding sites*, LBS) que consisten en una depresión hidrofóbica dentro del dominio *kringle* formada por residuos aromáticos, circunscripta por una zona de carga aniónica en un extremo y una zona catiónica en el otro extremo, a una distancia de aproximadamente 7 Å. Esta disposición de cargas genera un sitio de anclaje para compuestos anfotéricos tipo ω-amino-ácidos

carboxílicos, como lisina o el ácido 6-aminocaproico (EACA), cuyas cargas opuestas se encuentran a una distancia aproximada de 7 Å. La interacción entre el ligando y el sitio LBS se debe además a interacciones de tipo *van der Waals* entre los carbonos metilo del ligando y los residuos aromáticos de los aminoácidos del dominio LBS. Estos dominios poseen diferente afinidad y especificidad por ligandos análogos a lisina. Por ejemplo, el sitio de mayor afinidad para EACA se encuentra en el *kringle* 1, seguido por el *kringle* 4 y 5, mientras que el *kringle* 2 tiene baja afinidad y el *kringle* 3 no interacciona con EACA; los *kringles* 5 y 1 serían los responsables de la interacción con residuos lisina presentes en la fibrina.

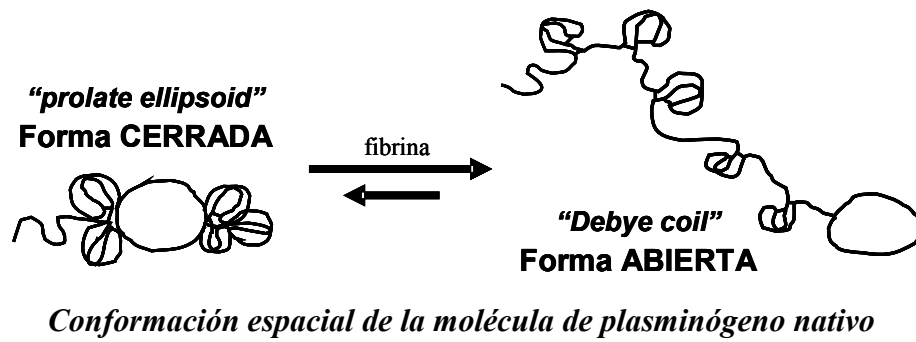


Sitios de unión a lisina (LBS, lysine binding sites)

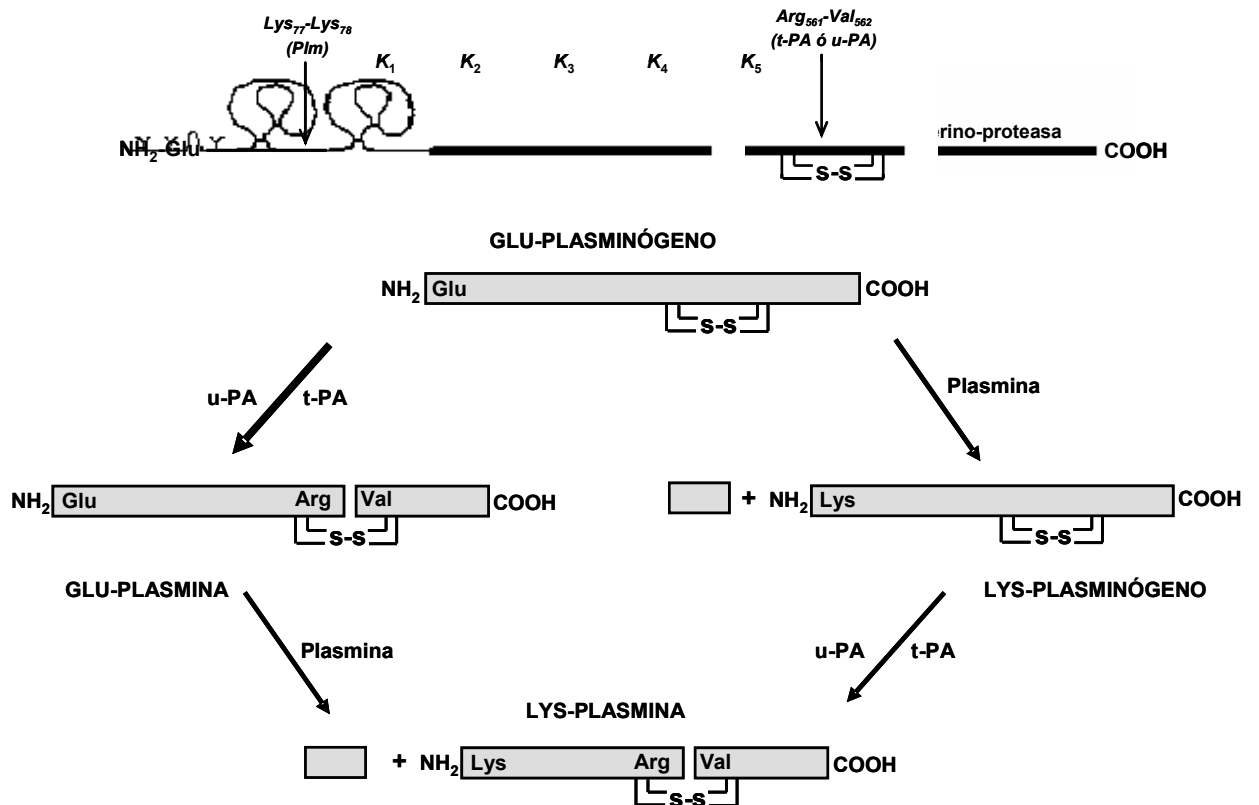
A: Aminoácidos que forman el dominio LBS del *kringle* 4 del plasminógeno (en rojo, azul y gris, aminoácidos básicos, ácidos y aromáticos).

B: Interacción entre el ácido 6-aminocaproico (EACA, modelo de residuos lisina C-terminal) y el dominio LBS presente en el *kringle* 4 del plasminógeno.

El plasminógeno nativo posee un ácido glutámico N-terminal y, por lo tanto, se lo denomina Glu-Plg. En el Glu-Plg, el residuo Lys₅₀ y/o ₆₂ es flexible y puede unirse a los sitios LBS presentes en los dominios *kringles* de la misma molécula ⁽¹⁷⁾. Esta interacción intramolecular condiciona la conformación espacial del Glu-Plg a una forma cerrada, conocida como *prolate ellipsoid*, en la que los 5 *kringles* y el dominio catalítico interactúan, quedando restringido el acceso de los activadores del Plg al sitio de activación. En presencia de fibrina el Glu-Plg cambia su conformación espacial y adquiere una configuración abierta y flexible conocida como *Debye coil*, que resulta más fácilmente activable a Plm ⁽¹⁸⁾.



La plasmina, obtenida por activación del Plg, es una serinoproteasa de dos cadenas unidas por puentes disulfuro. La cadena pesada de la Plm contiene los 5 *kringles* y la cadena liviana contiene el sitio activo en el extremo C-terminal.



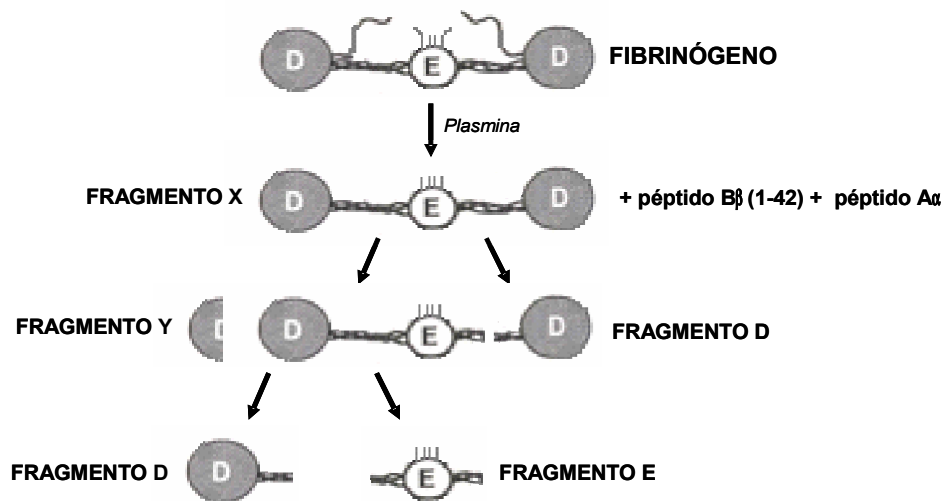
Esquema de activación de plasminógeno a plasmina

Esquema de la molécula de plasminógeno y productos del proceso de activación por u-PA y t-PA. Se indican los sitios de clivaje proteolítico por t-PA, u-PA y plasmina (Plm).

El Glu-Plg presenta en la porción N-terminal sitios sensibles a Plm (Arg₆₈-Met₆₉, Lys₇₇-Lys₇₈ y Lys₇₈-Val₇₉) que dan lugar a una forma de Plg parcialmente degradada llamada Lys-Plg, que presenta mayor afinidad por la fibrina y es más fácilmente activada a Lys-Plm debido a que carece del péptido N-terminal responsable de la interacción intramolecular con los sitios LBS de los dominios *kringles*. Si bien esta reacción ha sido demostrada *in vitro*, en condiciones fisiológicas parece no ocurrir, probablemente debido a que la Plm libre es rápidamente inactivada por α_2 -AP. Estudios con anticuerpos monoclonales específicos para Lys-Plg no han podido detectar Lys-Plg libre ni Lys-Plm unida a α_2 -AP en plasma humano normal, ni en pacientes que han recibido terapia trombolítica ⁽¹⁹⁾.

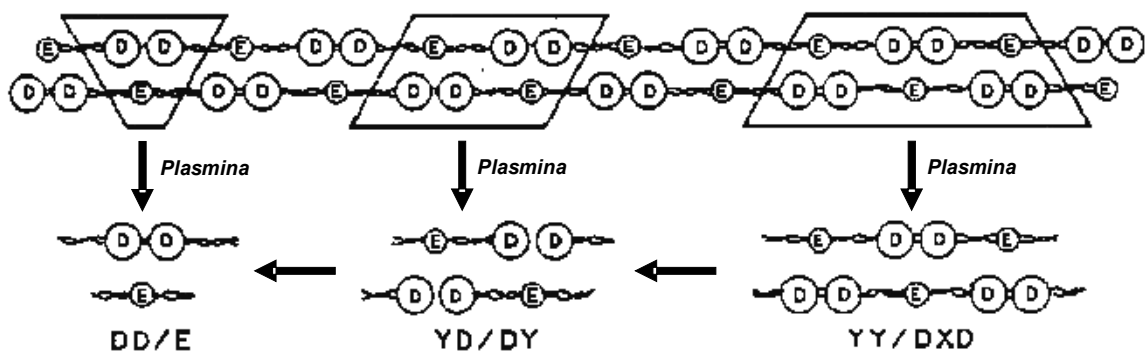
La plasmina cataliza la hidrólisis de enlaces de la fibrina C-terminal a residuos arginina y lisina conduciendo a la lisis del coágulo (fibrinólisis, solubilización de la red de fibrina). Esta serinoproteasa también tiene acción sobre fibrinógeno, factor VIII y V, aunque fisiológicamente estas reacciones no ocurren ya que los activadores del Plg prácticamente no activan al Plg en medio plasmático y las pequeñas cantidades de Plm generadas son inhibidas por la α_2 -AP en pocos segundos.

La acción de Plm sobre el fibrinógeno (fibrinogenólisis) genera un conjunto de fragmentos típicos denominados conjuntamente productos de degradación de fibrinógeno (pdf). Sólo 50 ó 60 de los 362 potenciales enlaces lisina-arginina del Fbg son clivados, 10 % de ellos rápidamente y el resto más lentamente. Inicialmente, la Plm libera el extremo C-terminal de la cadena A α y una porción del extremo N-terminal de la cadena B β (fragmento B β 1-42), originando el fragmento X. Luego la Plm hidroliza las tres cadenas polipeptídicas a lo largo de una región *coil-coiled*, dividiendo el fragmento X asimétricamente en fragmento Y (retiene el dominio D conectado al dominio central E) y fragmento D. Posteriormente, el clivaje de la región *coil-coiled* del fragmento Y origina un segundo fragmento D y el fragmento E, que contiene las porciones N-terminales de las 6 cadenas polipeptídicas del Fbg. Mientras que el fragmento X es lentamente coagulable por trombina, los fragmentos Y, D y E tienen efectos anti-polimerizantes debido a que interrumpen las interacciones entre monómeros de fibrina para formar protofibras.



Acción de plasmina sobre fibrinógeno (fibrinogenolisis)

Mientras que la degradación mediada por Plm de la fibrina no entrecruzada es idéntica a la degradación de Fbg (excepto por la formación del fragmento N-terminal β 15-42), la degradación de fibrina entrecruzada es más lenta y, debido a la presencia del enlace γ - γ producto del entrecruzamiento por factor XIIIa, se originan fragmentos diferentes que en su conjunto se denominan productos de degradación de fibrina (PDF). El producto final de la degradación de fibrina entrecruzada es el dímero D (dos nódulo D entrecruzados por factor XIIIa) y el fragmento E libre o unido no covalentemente al dímero D, mientras que los productos intermedios son combinaciones de fragmentos X, Y y D de alto peso molecular.



Acción de plasmina sobre fibrina (fibrinolisis)

In vivo, la fibrina parcialmente degradada induce una mayor activación del sistema fibrinolítico, debido a que se generan nuevos residuos lisina C-terminal que favorecen la interacción fibrina/Glu-Plg y el consiguiente cambio conformacional que favorece la activación mediada por los activadores de Plg. Además, la acción de la Plm sobre la fibrina y la activación del Plg mediada por los activadores fisiológicos dependen de la estructura del gel ⁽²⁰⁾.

ACTIVADORES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

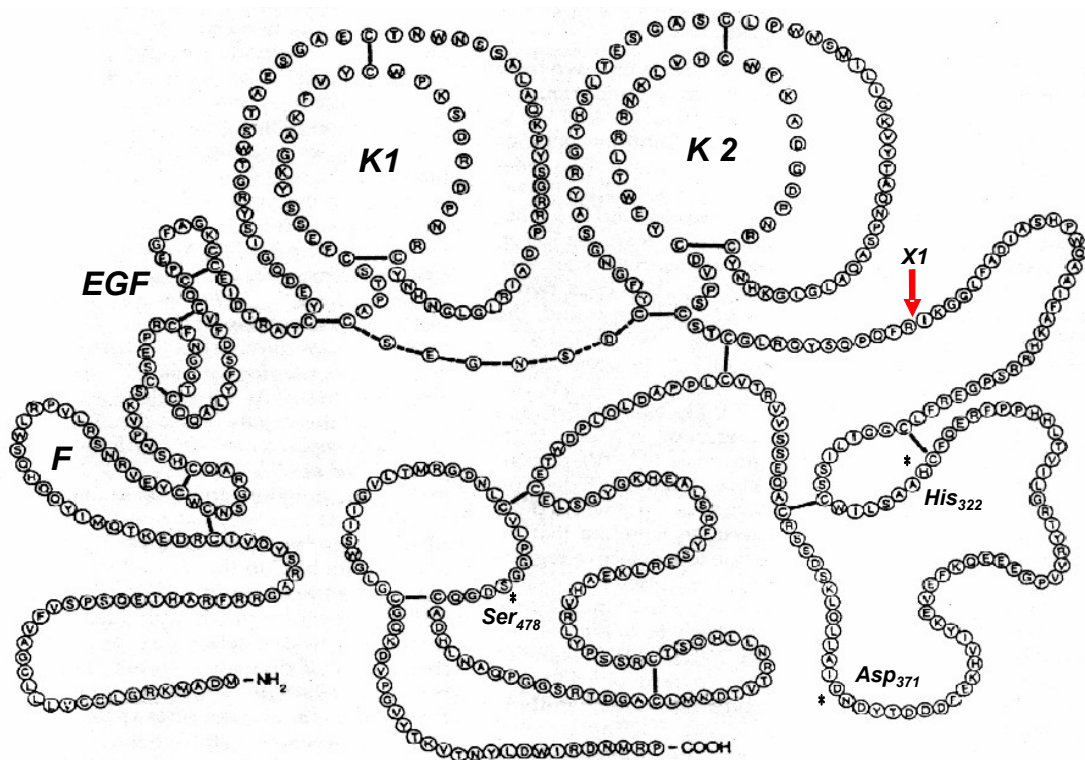
La activación de Plg a Plm ocurre por la acción de diversos activadores que clivan el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del Plg. Existen dos activadores fisiológicos de plasminógeno principales, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador tipo urinario (u-PA), cuyos nombres se deben a las fuentes originales de purificación. Además, existe una vía de activación en la que participan los factores de la fase de contacto y también existen activadores de plasminógeno exógenos, utilizados en terapia trombolítica.

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) es una serinoproteasa, también conocida como activador vascular o extrínseco de Plg. El t-PA es producido y secretado principalmente por célula endotelial y sería el principal activador fisiológico en la remoción de la fibrina del árbol vascular. Sin embargo, monocitos, megacariocitos, células de músculo liso, fibroblastos y células neuronales también producen t-PA.

El t-PA es liberado de la célula endotelial en forma continua (vía constitutiva) o es almacenado en vesículas intracelulares y liberado en respuesta a estímulos extracelulares (bradiquinina, histamina, acetilcolina, endotelina, agentes β -adrenérgicos, etc.). En condiciones fisiológicas normales, circula en plasma a una concentración aproximada de 5 $\mu\text{g/ml}$ (70 pM) y tiene una vida media de 3 minutos. La actividad de t-PA es baja a la noche y en las primeras horas de la mañana y luego aumenta hasta 3 veces durante el día⁽²¹⁾. La mayor parte del t-PA circula unido a PAI-1, siendo la actividad de t-PA libre en plasma raramente mayor a 0,5 U/ml (1 $\mu\text{g/L}$).

El t-PA es secretado como una proteína de una sola cadena polipeptídica (sct-PA: *single chain tisular plasminogen activator*) de 572 residuos aminoacídicos, de peso molecular 72 kDa que fácilmente puede convertirse en una molécula de dos cadenas (tct-PA: *two chain tisular plasminogen activator*) unidas por puentes disulfuro, por acción de Plm o calicreína

que hidrolizan el enlace Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ del sct-PA. El sct-PA no es un zimógeno, sino una serinoproteasa activa que presenta actividad enzimática similar a tct-PA en presencia de fibrina. La molécula de t-PA presenta una región N-terminal de aproximadamente 40 aminoácidos, seguidos de un dominio *finger*, un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), dos dominios *kringles* y en el extremo C-terminal presenta el dominio serinoproteasa que contiene el sitio activo formado por la tríada catalítica His₃₂₂-Asp₃₇₁-Ser₄₇₈. El sitio de clivaje Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ se encuentra luego del *kringle 2*.



Esquema de la molécula de t-PA

F: dominio *finger*. **EGF:** dominio *epidermal growth factor*. **K (1 y 2):** *kringles 1 y 2*.

X₁ (Arg₂₇₅-Ile₂₇₆): enlace clivado por Plm o calicreína originando tct-PA.

Dominio serinoproteasa: contiene la tríada catalítica Asp, His, Ser.

Funcionalmente, el dominio *finger* está relacionado con la unión de t-PA a fibrina independiente de LBS, el dominio EGF está relacionado con la depuración de t-PA vía reconocimiento de receptores tipo manosa y, si bien no se han descrito funciones biológicas asociadas al *kringle 1*, el dominio *kringle 2* otorga afinidad por fibrina, lisina, ω-amino-ácidos carboxílicos y receptores celulares como anexina II. El *kringle 2* del t-PA tiene similitud estructural con el dominio *kringle 4* del Plg, sin embargo, su afinidad por

EACA (modelo de interacción con residuos lisina C-terminal) y por N-acetil lisina-metil éster (modelo de interacción con residuos lisina intra-catenarios) es similar, lo que indicaría que el t-PA a diferencia del Plg, no prefiere residuos lisina C-terminal para unirse a fibrina.

El t-PA es una serinoproteasa altamente específica cuyo único sustrato es el Plg. En ausencia de fibrina el t-PA es un activador ineficiente, mientras que en presencia de fibrina la reacción de activación por ambas formas de t-PA se encuentra potenciada. Si bien la afinidad de sct-PA y tct-PA por fibrina es similar, sería mayor para sct-PA.

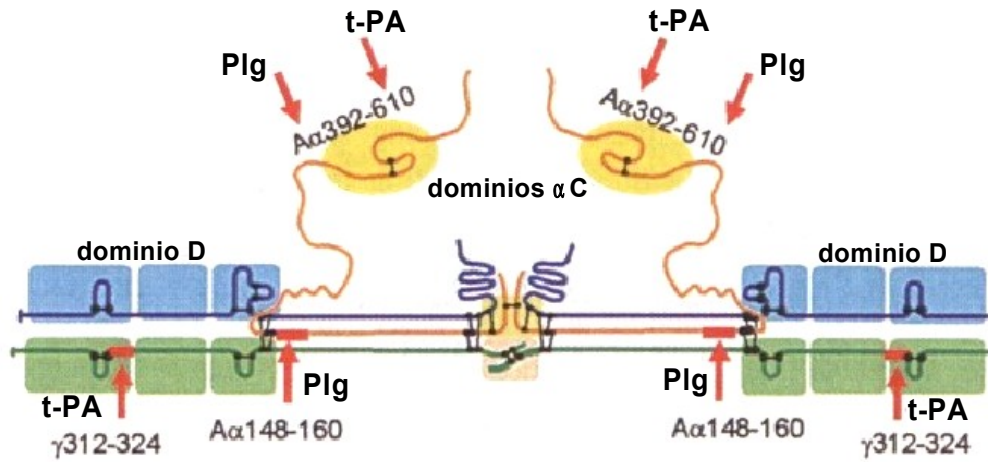
Por otro lado, la afinidad de t-PA por fibrina aumenta aproximadamente 20 veces en presencia de plasminógeno indicando que el mecanismo de activación implicaría la formación de un complejo ternario t-PA/Plg/fibrina o que el t-PA se uniría al Plg, que debido a su unión a fibrina ha adquirido la conformación abierta. En una segunda etapa, a medida que la fibrina es degradada se forman nuevos sitios de unión de t-PA y Plg, exposición de nuevos enlaces lisina C-terminal, lo que constituye un *feedback* positivo para el sistema fibrinolítico. Además, la fibrina tiene un efecto protector sobre la inactivación de Plm (vida media 80 seg) por α_2 -AP mientras que, a medida que transcurre la degradación del trombo, la Plm libre es inhibida rápidamente (vida media 0,15 seg). Por lo tanto, la fibrina no sólo actúa como sustrato de la Plm sino que cumple un rol muy importante en la iniciación de la fibrinólisis.

Mecanismo de activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrin(ogeno)

Se han identificado en la molécula de fibrinógeno, dos pares de sitios de unión a t-PA y Plg, en el dominio α C-terminal y en el dominio D, que se exponen debido a cambios conformacionales producidos durante la conversión de fibrinógeno en fibrina ⁽²²⁾.

En el dominio α C-terminal, los residuos A α 392-610 serían los responsables de la unión de t-PA y Plg, a través de una interacción dependiente de LBS que involucraría a los dominios *kringles*. El t-PA y el Plg no compiten por la unión al dominio α C, indicando que se unirían a diferentes sitios aún no claramente establecidos. Este dominio, críptico en la molécula de Fbg, se expondría solamente luego de la liberación de los fibrinopéptidos A y B, cuando los dominios α C se disocian entre sí y del dominio E. Por otro lado, se ha demostrado que la degradación de este dominio por Plm anula su capacidad de unir t-PA y

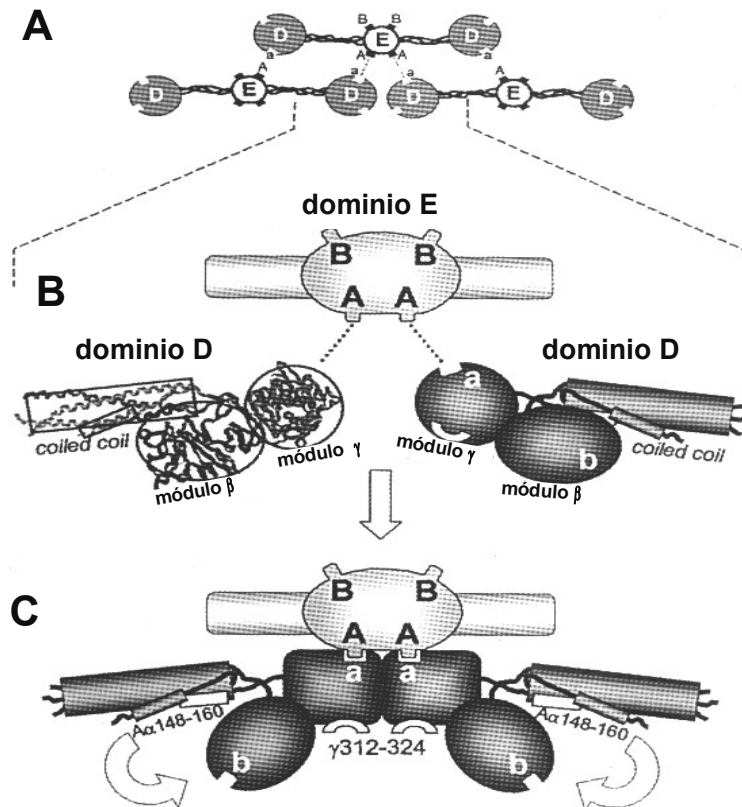
Plg, quedando abolido su efecto potenciador cuando el dominio α C es liberado a circulación.



Localización de sitios de unión a plasminógeno y t-PA en fibrina-fibrinógeno

Se indica la localización de los sitios de unión a plasminógeno (Plg) y t-PA en la molécula de fibrina-fibrinógeno. Las cadenas α , β y γ se indican con color naranja, azul y verde respectivamente.

En el dominio D, los residuos involucrados en la unión de t-PA y Plg serían A α 148-160 y γ 312-324. Los residuos A α 148-160 serían responsables de la unión a Plg y t-PA con similar afinidad, a través de una interacción dependiente de LBS que involucraría a los dominios *kringles*. Aunque, teniendo en cuenta las concentraciones fisiológicas de Plg y t-PA, este sitio estaría saturado por Plg. Por otro lado, los residuos γ 312-324 unirían solamente t-PA, a través de una interacción independiente de LBS, que probablemente involucraría al dominio *finger*. Ambos residuos en el dominio D, se encuentran escondidos de la molécula de fibrinógeno intacto, pero serían expuestos por el cambio conformacional producido luego de la liberación de fibrinopéptidos A y B, durante la formación de asociaciones no covalentes entre sitios complementarios Aa (A *knobs*, presentes en el dominio E y a *holes*, presentes en el dominio D) de monómeros adyacentes. Estos residuos A α 148-160 y γ 312-324 se encuentran espacialmente cercanos y favorecerían el encuentro entre las moléculas de t-PA y Plg sobre la superficie de la fibrina.



Exposición de sitios críticos en el dominio D del fibrinógeno

A: Esquema de un trímero de fibrina. No se dibujan los dominios αC para facilitar la observación del gráfico.

B: Versión ampliada de la interacción entre dominio E y D de monómeros adyacentes.

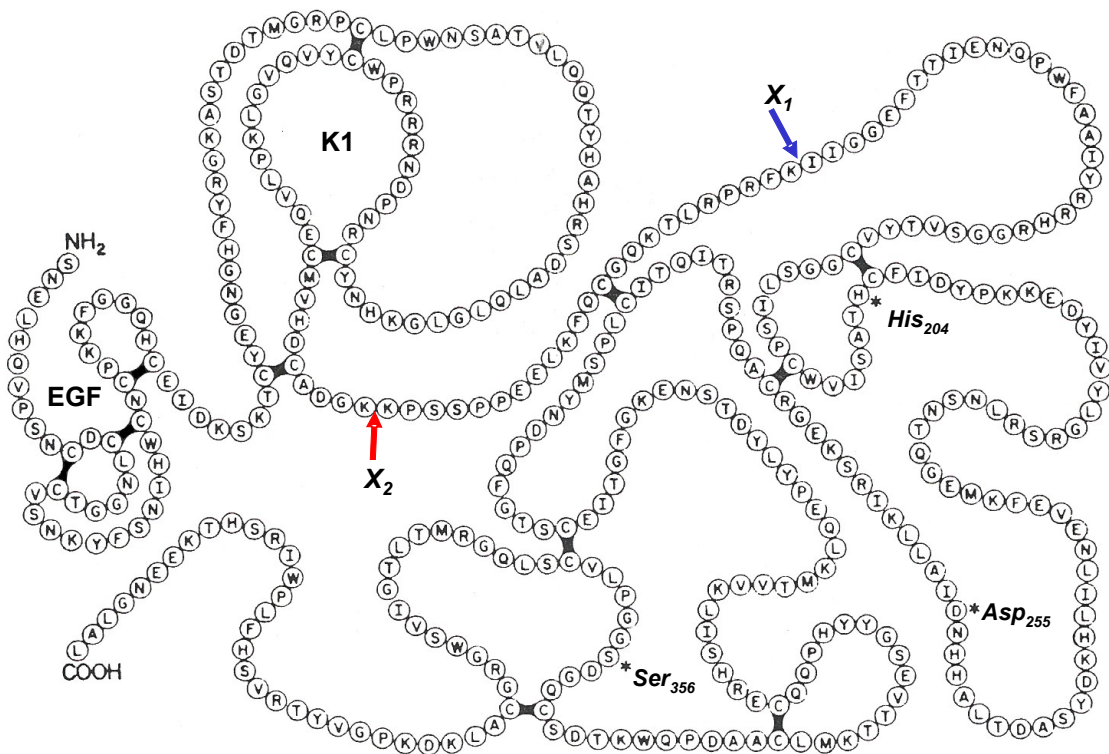
C: Exposición de los residuos de unión a plasminógeno ($A\alpha$ 148-160) y a t-PA (γ 312-324).

El activador del plasminógeno de tipo urinario (u-PA) es una glicoproteína de 54 kDa, sintetizada principalmente por células endoteliales y renales, aunque también por células epiteliales, monocitos y macrófagos. Se encuentra en plasma en una concentración de 2 a 4 ng/ml, tiene una vida media de 7 minutos y, a diferencia de t-PA, no circula unido a PAI-1 ni presenta fluctuaciones circadianas de los niveles plasmáticos.

El u-PA es secretado como una proteína de una sola cadena (*single chain urinary plasminogen activator*, scu-PA), también denominada pro-uroquinasa (pro-UK). La molécula de scu-PA presenta en la región N-terminal un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*; que interactúa con receptores celulares), seguido de un dominio *kringle* (que estabilizaría la interacción con receptores celulares y no tiene afinidad por fibrina) y, en el extremo C-terminal, presenta el dominio

serinoproteasa que contiene el sitio activo formado por la tríada catalítica His₂₀₄-Asp₂₅₅-Ser₃₅₆.

La activación de pro-UK (o scu-PA) se produce por clivaje del enlace Lys₁₅₈-Ile₁₅₉, mediado por Plm, factor XIIIa o calicreína, originando una proteína de dos cadenas (*two chain urinary plasminogen activator*, tcu-PA) también denominada uroquinasa (UK). El tcu-PA presenta dos formas activas: HMW-UK (por *high molecular weight-UK*) que mantiene la longitud completa o LMW-UK (por *low molecular weight-UK*) que ha perdido el dominio EGF y *kringle* por acción de Plm en el enlace Lys₁₃₅-Lys₁₃₆, y no tiene afinidad por receptores celulares.



Esquema de la molécula de u-PA

EGF: dominio epidermal growth factor. **K 1:** kringles 1.

X₁ (Lys₁₅₈-Ile₁₅₉): enlace clivado por Plm, factor XIIIa o calicreína originando tcu-PA.

X₂ (Lys₁₃₅-Lys₁₃₆): enlace clivado por Plm originando LMW-UK (*low molecular weight-uroquinasa*).

Domínio serinoproteasa: contiene la tríada catalítica Asp, His, Ser que se expone durante la activación de scu-PA a tcu-PA.

El u-PA, a diferencia del t-PA, tiene la capacidad de activar al Plg por clivaje del enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ en ausencia de fibrina. Mientras que el t-PA sería el principal activador vascular de la fibrinólisis, el u-PA cumpliría funciones relacionadas con la proteólisis pericelular; aunque también ha sido propuesto como un sistema amplificador del t-PA, ya

que se ha observado que existe un efecto sinérgico cuando se utiliza t-PA seguido de u-PA en modelos experimentales.

Actualmente se considera que el scu-PA plasmático no sería un verdadero zimógeno, sino que tendría aproximadamente 0,4 % de la actividad del t-PA y que, a pesar de no unirse a fibrina, tendría mínima acción sistémica. El scu-PA y el t-PA inducirían la activación del sistema fibrinolítico por mecanismos complementarios. El t-PA activaría el Glu-Plg unido a fibrina y, a medida que se genera Plm, la degradación parcial de fibrina generaría nuevos sitios lisina C-terminal que aumentarían la unión de Glu-Plg a fibrina. El scu-PA se uniría con alta afinidad al Glu-Plg ⁽²³⁾ y activaría selectivamente Glu-Plg unido a fibrina parcialmente degradada. Posteriormente, la generación de pequeñas cantidades de Plm convertirían scu-PA en t-PA y se amplificaría la activación de Plg y scu-PA. Por lo tanto, la activación de scu-PA ocurriría solamente sobre fibrina parcialmente degradada por acción de t-PA.

Por otro lado, durante la activación de la coagulación se produce activación del sistema de contacto (precalicreína, HMWK y factor XII) generándose calicreína ⁽²⁴⁾, que es un eficiente activador de scu-PA. De modo que, donde ocurra activación del sistema de contacto puede activarse scu-PA, incluso en ausencia de Plg.

Existe un receptor común en distintas células (u-PAR; receptor de u-PA), a través del cual el u-PA se une principalmente a plaquetas, monocitos y células endoteliales. Este receptor tiene alta afinidad por scu-PA y t-PA y promueve la activación de Plg mediada por u-PA sobre superficies celulares (mecanismo de colocalización), además el u-PA unido al receptor es inhibido por PAI-1 con menor eficiencia ⁽²⁵⁾.

Por lo tanto, lejos de no tener importancia en el proceso de degradación de fibrina, el u-PA ejercería principalmente su función en procesos de degradación de matriz extracelular y migración celular y también participaría en procesos de reparación tisular, inflamación, invasión tumoral y metástasis ^(26, 27).

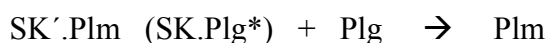
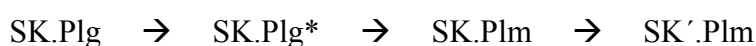
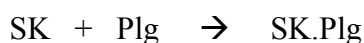
Los activadores exógenos ⁽²⁸⁾ de Plg se utilizan en terapia trombolítica (inducción farmacológica de la disolución de un coágulo por infusión intravenosa de un activador del Plg). Actualmente se encuentran disponibles: estreptoquinasa (SK), t-PA recombinante (rt-PA o *alteplase*), derivados de rt-PA como *reteplase*, *lanoteplase*, *monteplase* y *tenecteplase*, complejo Plg-SK anisolado (APSAC o *anistreplase*), t-PA o uroquinasa,

scu-PA recombinante (rscu-PA, rpro-UK o *saruplase*) y estafiloquinasa recombinante y sus derivados.

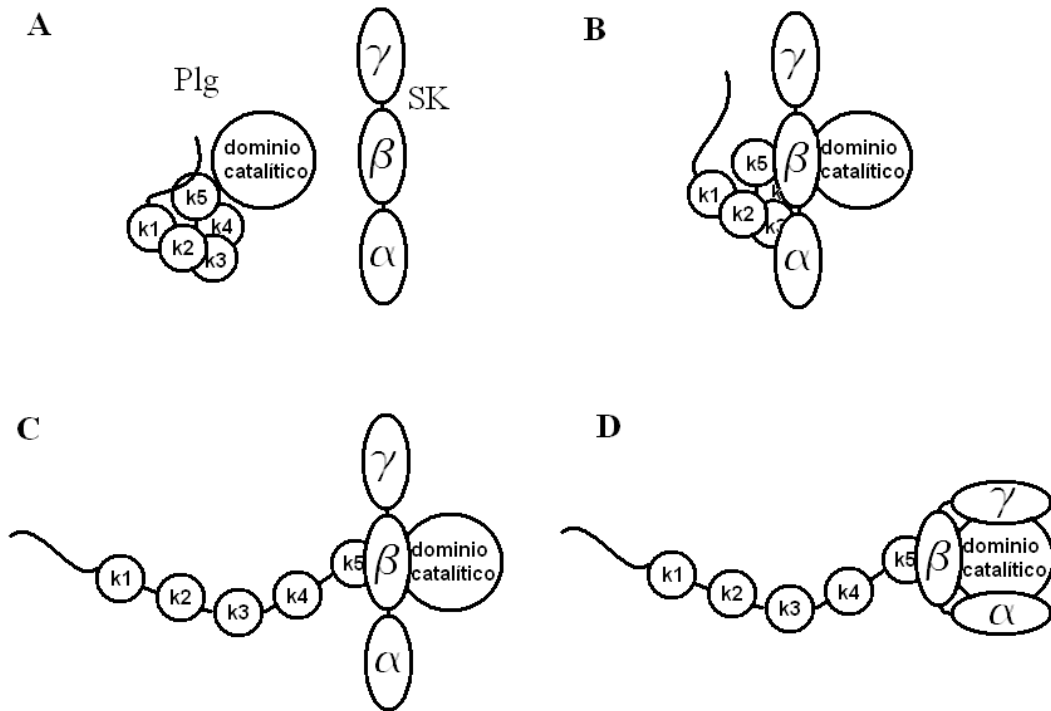
Estos activadores exógenos pueden clasificarse en dos grupos: aquellos que presentan especificidad por fibrina y no producen activación sistémica de Plg (rt-PA y derivados, estafiloquinasa y derivados y, en cierta medida, scu-PA) y los que activan el sistema Plg/Plm en forma sistémica y por lo tanto no sólo degradan la fibrina sino que también producen proteólisis de otras proteínas plasmáticas como factor VIII y V, fibrinógeno, factor von Willebrand y componentes del sistema complemento (estreptoquinasa, tcu-PA y APSAC).

La estreptoquinasa (SK) es una proteína hemolítica aislada de colonias de estreptococos β hemolítico, altamente antigénica y que post-inyección intravenosa presenta una vida media de 15 a 30 minutos en circulación.

La SK no es una enzima y para expresar su función hemolítica forma un complejo estequiométrico 1:1 con el Plg (SK.Plg) que luego sufre un cambio de conformación, dependiente del tiempo y la temperatura, exponiendo el sitio activo de la molécula de Plg (Plg*) sin clivaje proteolítico. En un segundo paso, el Plg modificado (Plg*) es convertido auto-catalíticamente en Plm y, posteriormente, la Plm degrada proteolíticamente la molécula de estreptoquinasa (SK'). Finalmente los complejos SK'.Plm y posiblemente SK.Plg* actúan como potentes activadores de Plg libre.



La molécula de SK se uniría al dominio *kringle 5* del Plg a través de una lisina presente en un residuo tipo *hairpin loop* expuesto en su dominio β ⁽²⁹⁾. Esta interacción desplaza la interacción intramolecular entre el extremo N-terminal del Plg y el dominio *kringle 5*, permitiendo que el Plg adquiera la conformación abierta y, posteriormente, que los tres dominios de la SK interactúen con la unidad catalítica del Plg estabilizando el complejo Plg.SK ⁽³⁰⁾.



Mecanismo de activación de plasminógeno por estreptoquinasa

A, B, C y D: etapas de la activación de plasminógeno por estreptoquinasa

Plg: plasminógeno, se indican los dominios kringles 1 a 5 (K 1 a 5), la porción N-terminal y el dominio catalítico.

SK: estreptoquinasa, se indican los dominios α , β y γ .

Si bien la SK no se une a la fibrina, los complejos SK-Plg* y SK.Plm tienen cierta afinidad por fibrina ya que conservan la funcionalidad del sitio LBS del *kringle* 1 del Plg. Además, a través de LBS de la molécula de Plg, los complejos SK.Plg y SK.Plm se unen a hepatocitos y células endoteliales. Por otro lado, si bien el complejo Plg(Plm).SK reacciona con α_2 -AP y α_2 -macroglobulina, la Plm en el complejo SK.Plm pierde su alta afinidad por la α_2 -AP, lo que explicaría la actividad sistémica de la SK.

La uroquinasa (UK) de uso terapéutico es aislada de orina humana (tcu-PA, HMW-UK) o de células de riñón fetal humano (tcu-PA, LMW-UK)⁽³¹⁾. Ambos tipos de UK presentan propiedades farmacocinéticas similares. Si bien la UK no se une a la fibrina y cuando se administra produce un estado proteolítico general, su principal ventaja, a pesar de su alto costo, es que tiene menor antigenicidad y un tiempo de vida medio más corto que la SK. Por otro lado, existe una forma recombinante de scu-PA (*saruplase*), expresada en *Escherichia coli*, que presenta la ventaja de tener especificidad por fibrina.

El activador tisular del Plg (t-PA) de uso terapéutico es expresado en células de melanoma de Bowes (t-PA natural) o se obtiene por expresión en células de ovario de *hamster* (*alteplase* o *rt-PA*)⁽³²⁾. Diversos estudios han demostrado que el rt-PA presenta una cinética de activación del Plg similar al t-PA humano y tiene alta especificidad por la fibrina.

Existen además, **nuevos agentes trombolíticos** mutantes y variantes derivadas de t-PA y u-PA, cuyo desarrollo ha permitido reducir la depuración, disminuir la reactividad frente a inhibidores plasmáticos y mantener o aumentar la capacidad como activadores de Plg y su afinidad por la fibrina. Actualmente el valor terapéutico de estos nuevos agentes trombolíticos, eficacia y seguridad en el tratamiento de pacientes con eventos tromboembólicos, está siendo evaluado en estudios a gran escala.

INHIBIDORES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

La expresión de la actividad fibrinolítica es regulada por inhibidores fisiológicos que actúan a nivel de la activación de Plg (PAI-1, PAI-2 y C1-inhibidor) o directamente sobre la Plm (α_2 -antiplasmina y α_2 -macroglobulina). Además, existe un inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) que participa en el balance entre la formación de fibrina y su degradación.

Los inhibidores de los activadores del plasminógeno han sido denominados genéricamente PAI (*plasminogen activators inhibitors*). Se han descrito cinco proteínas diferentes con actividad inhibitoria: PAI-1, PAI-2, PAI-3 o inhibidor de la proteína C activada, proteasa nexina I y neuroserpina. Fisiológicamente, el PAI-1 sería el principal inhibidor de los activadores de Plg en circulación y en la mayoría de los tejidos, excepto en sistema nervioso central donde el principal regulador de la actividad de t-PA sería la neuroserpina.

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo-1 (PAI-1) es el principal inhibidor fisiológico de sct-PA, tct-PA y tcu-PA. Además es un inhibidor eficiente de Plm y participa en la regulación del proceso de adhesión celular durante la reparación tisular a través de su unión a la proteína adhesiva vitronectina (VTN)⁽³³⁾.

Es una glicoproteína de 52 kDa de una sola cadena que pertenece a la familia de las serpinas. El PAI-1 es producido por células endoteliales, hepatocitos, adipocitos y también es liberado de los gránulos α de las plaquetas durante la activación plaquetaria, aunque esta forma es menos activa que la forma plasmática.

El PAI-1 presenta diferentes conformaciones: activa, latente y sustrato. Es secretado a circulación como una serpina *activa* con capacidad inhibitoria, pero rápidamente pasa a la forma *latente* perdiendo su actividad por inserción espontánea del centro reactivo serpina. La conformación *sustrato* es una forma degradada espontáneamente que, si bien interacciona con los activadores de Plg, no forma complejos de inhibición.

En circulación el PAI-1 es inestable y la unión no covalente con VTN estabiliza la forma activa y aumenta su vida media (menos de 10 minutos). Los niveles antigénicos de PAI-1 son variables (1 a 40 ng/ml) y fluctúan durante el día en forma opuesta al t-PA. Los niveles antigénicos y la actividad de PAI-1 son altos por la mañana y luego descienden durante el día ⁽²¹⁾.

La molécula de PAI-1 presenta el sitio serpina reactivo (enlace P₁-P₁' Arg₃₄₆-Met₃₄₇ sensible a los activadores del Plg), un sitio de unión a VTN (aminoácidos 55, 109, 110, 116 y 123) ⁽³⁴⁾, varios sitio no serpina de interacción con t-PA ⁽³⁵⁾ y una zona de unión a heparina (Lys₆₅, Lys₆₉, Arg₇₆, Lys₈₀ y Lys₈₈) ⁽³⁶⁾. La formación del complejo de inhibición comienza cuando los activadores del plasminógeno clivan el enlace sensible (P₁-P₁') y se forma un enlace covalente entre el residuo P₁ y el aminoácido serina del sitio catalítico del activador del Plg. Este complejo inicial, luego sufre un cambio conformacional que produce la distorsión del sitio catalítico de los activadores del plasminógeno y la pérdida de actividad. Al mismo tiempo el PAI-1 pierde su afinidad por VTN y expone sitios críticos de interacción con receptores del tipo LDL (por *low density lipoprotein*) lo que acelera el mecanismo de depuración.

La VTN ⁽³⁷⁾ no sólo estabiliza la forma activa de PAI-1, sino que aumenta 300 veces la eficiencia inhibitoria sobre trombina. En forma simultánea, el PAI-1 transforma a la VTN nativa soluble en una forma activada con capacidad adhesiva. La unión con heparina, si bien no inhibe la interacción con los activadores del Plg, aumenta la interacción de PAI-1 con trombina ⁽³⁸⁾.

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno de tipo 2 (PAI-2) fue identificado inicialmente como un inhibidor de u-PA en placenta. En condiciones fisiológicas los

niveles plasmáticos de PAI-2 no son detectables pero aumentan significativamente en el tercer trimestre del embarazo, alcanzando valores de hasta 250 ng/ml ⁽³⁹⁾.

El PAI-2 es una proteína de una sola cadena, que se presenta en dos formas: una intracelular no glicosilada de 47 kDa y otra plasmática glicosilada de 60 kDa. Es un inhibidor perteneciente a la familia de las serpinas que inhibe rápidamente al tcu-PA, reacciona más lentamente con tct-PA y prácticamente no inhibe sct-PA ⁽⁴⁰⁾.

En circulación, los monocitos son una importante fuente de PAI-2, lo que representaría un reservorio de actividad anti-fibrinolítica y, debido a la migración dentro del trombo, podría aumentar la estabilidad del coágulo. Además, el PAI-2 puede ser entrecruzado por factor XIIIa a la fibrina (PAI-2_{Gln 83 y 86} y cadena α de la fibrina_{Lys 148,230 y/o 413}).

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 3 (PAI-3) o inhibidor de la proteína C activada ⁽⁴¹⁾ es un inhibidor tipo serpina no específico de síntesis hepática, que inhibe una gran variedad de proteasas: proteína C, trombina, factor XIa y XIIa, calicreína y muy lentamente t-PA y u-PA. Aunque su concentración plasmática (aproximadamente 100 nM) es alrededor de tres veces la concentración de PAI-1 y PAI-2, es un inhibidor ineficaz de los activadores del plasminógeno y actuaría en situaciones donde la activación de la fibrinólisis sobrepasa al efecto del PAI-1.

La proteasa nexina I ⁽⁴²⁾, es un inhibidor no específico de trombina, u-PA, t-PA (muy lentamente) y Plm. Es secretada por fibroblastos y forma complejos covalentes con la enzima activa que son internalizados y degradados por acción de las enzimas lisosomales. La proteasa nexina I actuaría como inhibidor del sistema fibrinolítico cuando las concentraciones de Plm o u-PA exceden la capacidad inhibitoria de la α_2 -AP o PAI-1.

El C1-Inhibidor es una glicoproteína de 105 kDa que pertenece a la familia de las serpinas. Tiene capacidad de inhibir sub-componentes activados del complemento (C1r y C1s), factor XIIa, factor XIa, calicreína y Plm. Su concentración plasmática es 1,7 μ M y fisiológicamente es el inhibidor de fibrinólisis dependiente de la fase de contacto, responsable de la regulación de la conversión de scu-PA a u-PA activo.

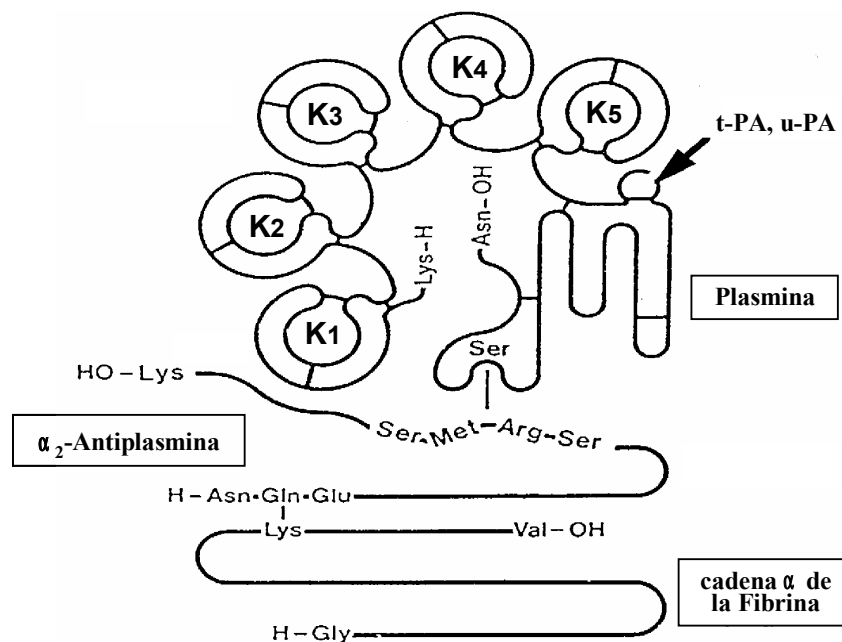
La α_2 -Antiplasmina (α_2 -AP) es el principal inhibidor fisiológico de Plm. Es una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular de 70 kDa perteneciente a la

familia de las serpinas. La α_2 -AP se sintetiza en hígado, su concentración plasmática es 70 mg/L (1 μ M) y tiene una vida media promedios de 3 días.

La α_2 -AP presenta un centro reactivo en el que el enlace Arg₃₅₄-Met₃₅₅ (P₁-P₁') es reconocido por el sitio catalítico de la Plm. Cuando la Plm cliva este enlace sensible se genera una unión covalente entre el residuo P₁ y el aminoácido serina del sitio catalítico de la Plm, formándose un complejo inactivo que es rápidamente depurado de circulación (vida media 0,5 días).

La α_2 -AP se une a la Plm a través del dominio LBS presente en el *kringle* 1 y por lo tanto tiene capacidad de unirse al Plg e interferir en la interacción Plg-fibrina, afectando la activación de Plg por t-PA. Si bien el residuo lisina del extremo C-terminal de la α_2 -AP responsable de la interacción con Plm o Plg no ha sido establecido exactamente, estaría involucrado el aminoácido intra-catenario Lys₄₃₆ y probablemente el aminoácido C-terminal Lys₄₅₂^(43, 44).

Por otro lado, la α_2 -AP tiene capacidad de estabilizar la fibrina ya que es entrecruzada por el factor XIIIa a la cadena A α del fibrinógeno o fibrina (α_2 -AP_{Gln2} y A α _{Lys303})⁽⁴⁵⁾, por lo tanto la Plm comenzaría a lisar el coágulo cuando se genera una cantidad de Plm tal que supere la concentración del inhibidor presente en el trombo.



Interacción Plasmina, α_2 -Antiplasmina y Fibrina

La α_2 -Macroglobulina (α_2 -MG) es un inhibidor de proteasas de amplio espectro que inhibe Plm y también forma complejos con u-PA y t-PA ⁽⁴⁶⁾. Es una glicoproteína de 725 kDa constituida por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas, unidas por 2 pares de puentes disulfuro. Se sintetiza en hepatocitos, fibroblastos y macrófagos, su concentración plasmática es 2,5 g/L (3 μ M) y tiene una vida media promedios de 5 días.

Cada subunidad de α_2 -MG presenta una región señuelo (Arg₆₈₁-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu₆₈₆) con especificidad para varias serinoproteasas. Luego de la acción proteolítica de la proteinasa sobre la región señuelo, el inhibidor sufre un cambio conformacional que atrapa la serinoproteasa. Si bien la reacción de inhibición requiere la acción de la serinoproteasa, el sitio activo de la proteinasa no está involucrado en la formación del complejo, y por lo tanto, aunque pierde su capacidad proteolítica frente a macromoléculas conserva su actividad frente a pequeños sustratos.

Fisiológicamente, la α_2 -MG actuaría como un reservorio anti-fibrinolítico que sería utilizado en situaciones donde la activación excesiva de la fibrinólisis hubiera agotado la capacidad inhibitoria de la α_2 -AP.

El Inhibidor de Fibrinólisis Activable por Trombina (TAFI) es una glicoproteína de 60 kDa de síntesis hepática, que circula en plasma como zimógeno en una concentración aproximada de 5,0 μ g/ml (75 nM).

Es activado por proteólisis del enlace Arg₉₂-Ala₉₃, para dar lugar a una enzima tipo carboxipeptidasa B dependiente de zinc. Si bien es sensible a proteólisis por trombina, Plm y tripsina, la reacción catalizada por estas enzimas es ineficiente y, se considera que el activador fisiológico sería el complejo trombina-trombomodulina ya que en presencia de TM la reacción aumenta 1.250 veces. Por otro lado, en presencia de heparina la activación de TAFI mediada por Plm está potenciada ⁽⁴⁷⁾.

El complejo trombina-TM también es responsable de la activación del sistema de la proteína C. Debido a que los niveles plasmáticos de TAFI y PC son relativamente bajos respecto de sus respectivas constantes de disociación con el complejo trombina-TM, ambas reacciones de activación ocurrirían simultáneamente con poca o mínima interferencia. En particular, los sitios de reconocimiento para PC y TAFI en TM y trombina son similares pero no idénticos. Por lo tanto, el complejo trombina-TM actuaría como un eje de balance entre el sistema de coagulación y fibrinolítico.

Si bien no se ha descrito un inhibidor de TAFIa, este inhibidor es inestable y pierde actividad espontáneamente por lo tanto su capacidad de suprimir fibrinólisis es trasciende y altamente dependiente de la temperatura. La vida media de TAFIa a temperatura corporal es de 10 minutos, mientras que a temperatura ambiente es de aproximadamente 2 horas y en hielo es indefinidamente estable ⁽⁴⁸⁾.

Mecanismo de acción de TAFI:

El TAFIa cataliza la remoción de residuos básicos (arginina y lisina) C-terminales de péptidos y proteínas y, actúa como supresor de la fibrinólisis eliminando principalmente residuos lisina C-terminales de la fibrina.

Considerando que inicialmente en respuesta a la formación de fibrina, se produce la liberación de t-PA de la célula endotelial y esta proteinasa activa el Plg a Plm. En particular, la reacción de activación de Glu-Plg está potenciada sobre la superficie de fibrina, por un mecanismo tipo templado en el que se unen t-PA y Plg, quedando restringida la activación de la fibrinólisis al coágulo. A medida que se forma Plm, se produce la disolución de la red de fibrina y se exponen nuevos sitios lisina C-terminal que proveen afinidad adicional por Glu-Plg y, en consecuencia, la capacidad cofactor de la fibrina aumenta. Este mecanismo representa una vía de retroalimentación positiva del sistema fibrinolítico que puede ser suprimida por acción del TAFIa ⁽⁴⁹⁾.

Por otro lado, el TAFIa elimina el efecto protector de la fibrina sobre la Plm ya que debido a que elimina los residuos lisina C-terminales de la fibrina, disminuye los sitios de interacción entre fibrina y los dominios *kringle* de la Plm. Consecuentemente, la Plm libre es más rápidamente inhibida por α_2 -AP. Otra consecuencia de la falta de retención de Plm sobre la fibrina sería que la acción de la Plm ocurriría al azar y no de forma localizada haciendo falta más cortes para producir la disolución del coágulo.

GLICOSAMINOGLICANOS

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos aniónicos, no ramificados, formados a partir de unidades repetidas de disacáridos, constituidos por unidades alternadas de un ácido urónico (ácido D-glucurónico (GluA) o ácido L-idurónico (IdoA)) y un aminoazúcar (D-galactosamina (GalN) o D-glucosamina (GluN))⁽⁵⁰⁾.

Se diferencian seis tipos de GAGs: ácido hialurónico (AH), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS), heparán sulfato (HS), heparina (Hep) y queratán sulfato (KS).

Sin embargo el AH no sería un GAG típico, ya que se presenta como una cadena muy larga de carbohidrato (miles de residuos de azúcar), formada por una secuencia regular y repetida de disacáridos (GluA (β 1 \rightarrow 3) GluNAc (β 1 \rightarrow 4)), mientras que el resto de los GAGs están formados por cadenas heterogéneas y más cortas (hasta 300 residuos de azúcar). Además el AH es el único GAG que no presenta ningún residuo de azúcar sulfatado y no interacciona covalentemente con proteínas, mientras que el resto de los GAGs presentan residuos sulfato y se unen a residuos serina de una proteína central a través de un trisacárido específico (xilosa-galactosa-galactosa) para formar proteoglicanos. Por otro lado, el KS se diferencia de los otros GAGs debido a que la unidad disacárido presenta una molécula de galactosa en lugar de un ácido urónico, por lo tanto no contiene grupos carboxilo en su estructura.

La estructura química de los GAGs se describe generalmente en función de la secuencia del disacárido que se repite con mayor prevalencia, el tipo de uniones entre las subunidades y los puntos típicos de sulfatación. Sin embargo cabe destacar que la composición real de los GAGs es compleja, por ejemplo el DS puede presentar en forma simultánea ambas formas de ácidos urónicos a lo largo de la cadena polisacárida (IdoA en forma mayoritaria y GluA en menor proporción) y puede tener uno o dos grupos sulfato por unidad de disacárido. Además, puede presentar zonas relativamente largas en las que prevalece el GluA seguidas de zonas en las que el ácido urónico más prevalente es el IdoA, que se conocen como bloques copoliméricos, así como número variable de unidades de disacáridos⁽⁵¹⁾. Por otro lado, el CS, HS y Hep también pueden presentar en forma simultánea ambas formas de ácidos urónicos, siendo mayoritario el GluA en CS y HS y el IdoA en Hep. Además, el HS y la Hep pueden presentar residuos de N-acetilglucosamina, glucosamina N-sulfato o N-acetilglucosamina-O-sulfato como amino-azúcares.

Estructura química de los Glicosaminoglicanos

contienen D-galactosamina (GalN)	CONDROITÍN SULFATO PM = 5-50 kDa GluA (β 1 \rightarrow 3) GalNAc-4S ó 6S-(β 1 \rightarrow 4)	DERMATÁN SULFATO PM = 15-40 kDa IdoA (α 1 \rightarrow 3) GalNAc-4S (β 1 \rightarrow 4)
contienen D-glucosamina (GluN)	HEPARÁN SULFATO PM = 5-12 kDa GluA (β 1 \rightarrow 4) GluNR'-6R (α 1 \rightarrow 4)	HEPARINA PM = 6-25 kDa IdoA-2S (α 1 \rightarrow 4) GluNS-6S (α 1 \rightarrow 4)
	QUERATÁN SULFATO PM = 4-20 kDa Gal (β 1 \rightarrow 4) GluNAc-6S (β 1 \rightarrow 3)	ÁCIDO HIALURÓNICO PM = 4-10.000 kDa GluA (β 1 \rightarrow 3) GluNAc (β 1 \rightarrow 4)

Se indica la secuencia del disacárido que se repite con mayor prevalencia y el peso molecular (PM) promedio de cada glicosaminoglicano.

Ácidos urónicos = ácido D-glucurónico (GluA) y ácido L-idurónico (IdoA).

Galactosamina = Gal.

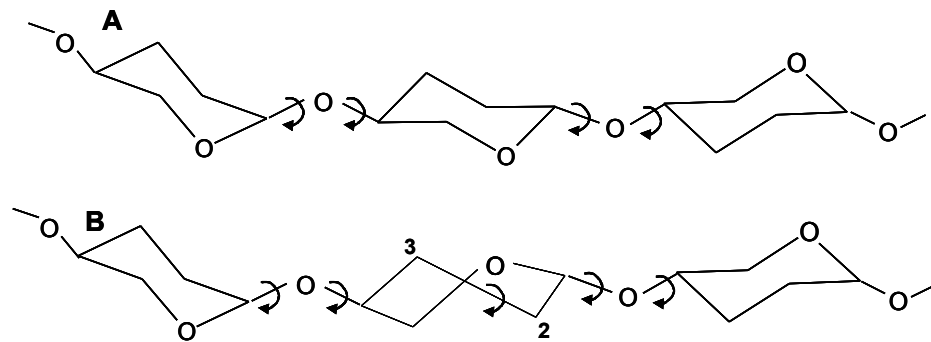
Amino-azúcar = N-acetil galactosamina (GalNAc), N-acetil glucosamina (GluNAc), glucosamina N-sulfatada (GluNS).

2S, 4S, 6S = O-sulfato en posición 2-, 4- ó 6-

R = H ó SO_3^-

R' = CH_3CO ó SO_3^-

Debido a la presencia de numerosos grupos carboxilo y sulfato a lo largo de la cadena polisacárida, los GAGs presentan una carga electrostática negativa global y por lo tanto, son hidrofílicos y debido a repulsiones electrostáticas intramoleculares adoptan configuraciones extendidas que se podrían esquematizar como un esqueleto lineal de carbohidrato recubierto por radicales aniónicos ⁽⁵²⁾. Además, debido a la flexibilidad de los enlaces glucosídicos, las cadenas de GAGs no tienen configuraciones rígidas, incluso debido a que el IdoA presenta dos conformaciones equienergéticas, se considera que aquellos GAGs que contienen ese ácido urónico son aún más flexibles que aquellos que contienen residuos más rígidos de GluA ⁽⁵³⁾. Por lo tanto, los GAGs tienden a formar configuraciones lineales y flexibles, a diferencia de la mayoría de las cadenas polipeptídicas que presentan estructuras tridimensionales fijas y globulares o helicoidales.



Libertad de rotación de las cadenas de glicosaminoglicanos

A = Cadena de GAG con residuos de ácido glucurónico.

B = Cadena de GAG con residuos de ácido idurónico. Se destaca el punto de rotación extra debido a las dos conformaciones equienergéticas del enlace C2-C3.

Los GAGs se sintetizan en el aparato de Golgi por adición de mono o disacáridos que posteriormente son modificados por reacciones secuenciales de epimerización y sulfatación, excepto el AH que es sintetizado en microsomas asociados a membrana celular. Fisiológicamente los GAGs se encuentran en formas solubles o unidas covalentemente a núcleos proteicos formando proteoglicanos (PG). Las cadenas proteicas de los PG son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso de la mayoría de las células y luego en el aparato de Golgi se adicionan al núcleo proteico múltiples cadenas de polisacáridos (90-95 % del peso total), en número y composición variable ⁽⁵⁴⁾.

En los tejidos, los PG se localizan intracelularmente (en gránulos secretores), en las superficies celulares, en la matriz extracelular y en las membranas basales ⁽⁵⁵⁾. Todos los

GAGs, excepto heparina que se encuentra intracelularmente en mastocitos del tejido conectivo y otras células hematopoyéticas que participan en la respuesta inmune e inflamatoria, están presentes como PG en la matriz extracelular, donde participan principalmente en procesos de difusión de moléculas hidrosolubles, migración, proliferación y adhesión celular. En superficies celulares: han sido descritos PG derivados de HS en la mayoría de los tipos celulares, proteoglicanos derivados de HS, CS y DS principalmente en células epiteliales y fibroblastos y PG derivados de CS y HS en células nerviosas ⁽⁵⁶⁾. Estos PG participan en interacciones célula-matriz extracelular, adhesión célula-célula y señalización celular. En sangre sólo se encuentran pequeñas cantidades de GAGs, en plasma y en células sanguíneas como plaquetas y leucocitos, presentes en su mayoría como PG de CS, HS y KS y en menor proporción de Hep, probablemente productos del catabolismo de PG tisulares ⁽⁵⁷⁾.

GLICOSAMINOGLICANOS EN HEMOSTASIA

La mayoría de las actividades biológicas de los GAGs están mediadas por interacciones con proteínas tisulares o plasmáticas, como proteínas de captación de lipoproteínas, factores de crecimiento polipeptídicos, proteínas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión y proteasas y anti-proteasas plasmáticas.

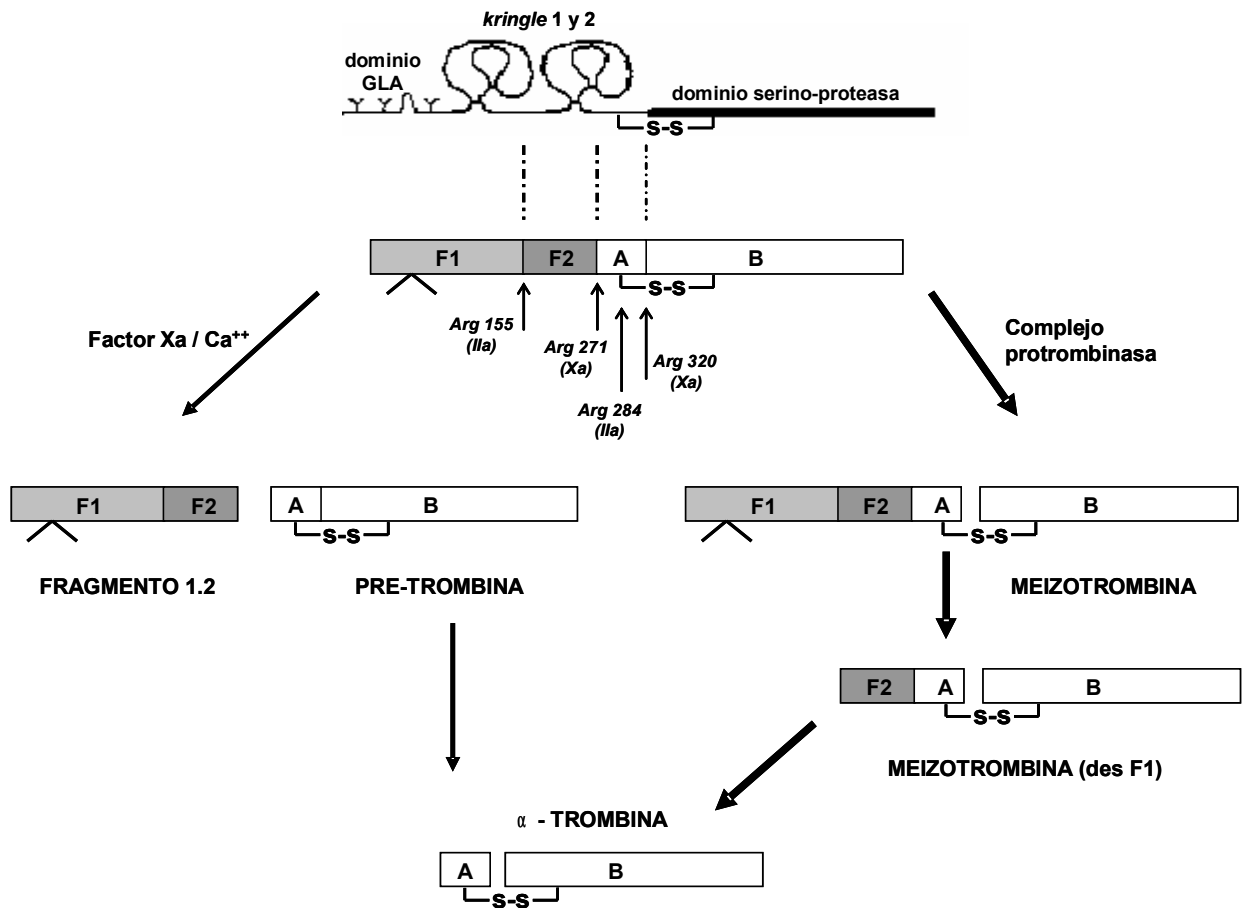
Particularmente en hemostasia, los GAGs son conocidos especialmente debido a sus propiedades anticoagulantes, principalmente debido a la acción del *heparán sulfato* y la *heparina* como catalizadores de la inhibición de factor Xa y trombina por antitrombina III y del *dermatán sulfato* como potenciador de la inhibición de trombina mediada por el cofactor II de la heparina. Por otro lado, el *condroitín sulfato* forma parte estructural de la trombomodulina (TM) y tiene propiedades anticoagulantes mediante: a) aumento de la afinidad de TM por trombina, potenciando la inhibición de los cofactores Va y VIIIa mediada por el sistema de la proteína C, b) estimulación de la inhibición de trombina por antitrombina III, c) estimulación de la inhibición de proteína C por el inhibidor de la proteína C y d) modulación de la dependencia de iones calcio para la activación de la proteína C ⁽⁵⁸⁾. Además, en presencia de *heparina* el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) unido a vitronectina adquiere capacidad de inhibir trombina ⁽⁵⁹⁾.

Si bien el mecanismo de acción de los GAGs incluiría interacciones iónicas inespecíficas entre los grupos aniónicos de los GAGs y grupos catiónicos de las proteínas, se ha demostrado que algunas de las actividades biológicas más relevantes de los GAGs

dependen de una secuencia específica de disacáridos y un típico patrón de grupos sulfato y carboxilo ⁽⁶⁰⁾. En particular los mecanismos de acción más ampliamente estudiados son la interacción de heparina y dermatán sulfato con antitrombina III y cofactor II de la heparina, respectivamente.

TROMBINA - ANTITROMBINA III - HEPARÁN SULFATO Y HEPARINA

La protrombina, precursor de la trombina, es una proteína vitamina K dependiente, cuya estructura presenta 4 dominios característicos: un dominio GLA, dos estructuras tipo *kringle* y un dominio precursor de serinoproteasa que contiene el sitio activo. Además, presenta una zona de unión a iones sodio, que participa en la determinación del rol procoagulante o antitrombótico, y dos sitios electropositivos o *anion binding sites* conocidos como exositos I de unión a fibrinógeno y exosito II de unión a glicosaminoglicanos. La protrombina es activada a trombina por el factor Xa a través de dos posibles mecanismos. El factor Xa libre activa protrombina lentamente por clivaje proteolítico en la posición Arg₂₇₁ y luego en Arg₃₂₀, mientras que formando parte del complejo protrombinasa sobre membrana fosfolipídica la reacción de activación es en orden inverso (Arg₃₂₀ y Arg₂₇₁) y la velocidad de generación de trombina es superior ⁽⁶¹⁾.



Esquema de activación de protrombina a trombina

Esquema de la molécula de protrombina y productos intermedios en el proceso de activación mediado por factor Xa libre o por el complejo protrombinasa. Se indican los sitios de clivaje proteolítico para factor Xa y trombina (IIa).

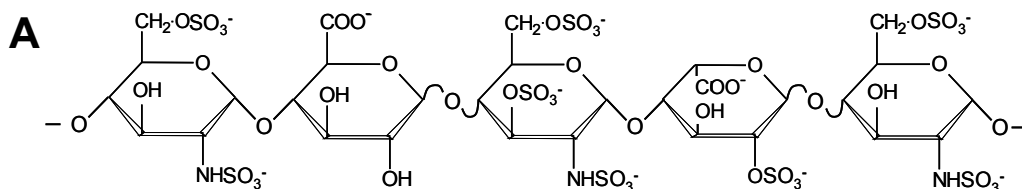
La meizotrombina es un intermediario obligado de la activación normal de protrombina y aunque su vida media es corta, tiene importantes funciones en el proceso de coagulación y como vasoconstrictor en la regulación del tono vascular. Si bien la meizotrombina tiene menor actividad sobre fibrinógeno y plaquetas que la trombina, su actividad sobre factor V y XI es similar a la trombina y es mejor activador de la proteína C que la trombina ⁽⁶²⁾.

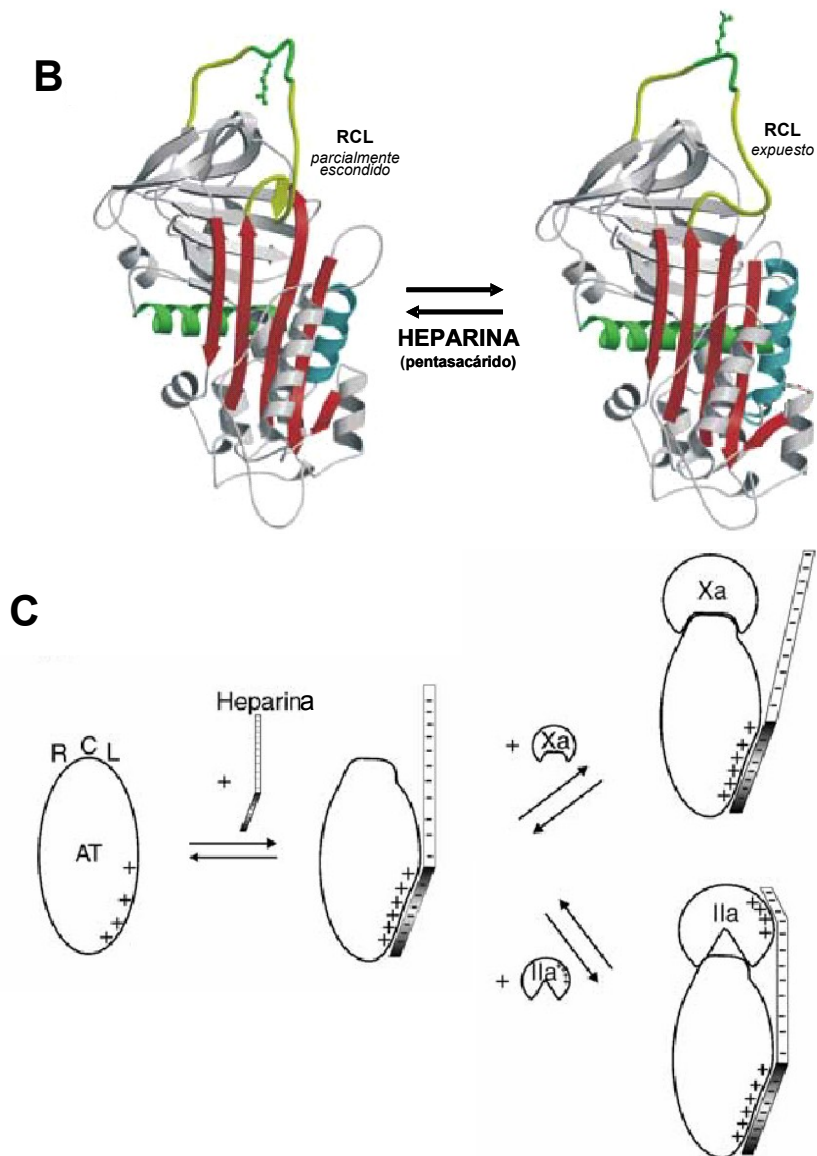
In vivo, la AT III es el principal inhibidor plasmático de trombina y además, tiene la capacidad de inhibir otras serinoproteasas de la cascada de coagulación, factores Xa, IXa, XIa, XIIa, calicreína y el complejo VIIa-FT, regulando tanto la acción de trombina como su generación.

El mecanismo de inhibición de las serpinas se conoce con el nombre de “sustrato suicida” ya que presentan un sitio reactivo (*reactive center loop, RCL*) que es reconocido por el sitio catalítico de las serinoproteasas como sustrato. La formación del complejo de inhibición comienza cuando la enzima cliva el enlace sensible (P₁-P₁’) presente en el RCL

de la serpina generándose un enlace covalente entre el residuo P₁ y el aminoácido serina del sitio catalítico de la serinoproteasa. Este complejo inicial, luego sufre un cambio conformacional en el que la serinoproteasa es translocada desde el polo reactivo de la serpina hacia el polo opuesto, lo que produce la distorsión de su sitio reactivo y la pérdida de actividad. En particular, la AT III es un inhibidor poco eficiente en comparación con la mayoría de las serpinas, ya que el RCL se encuentra parcialmente escondido en su estructura lo que dificulta el acceso de las serinoproteasas al enlace P₁-P₁'. Sin embargo, en presencia de heparina o heparán sulfato que actúan como cofactores, la AT III expone completamente su sitio reactivo aumentando su capacidad de inhibición de serinoproteasas⁽⁶³⁾.

La actividad cofactor de la AT III depende de la presencia de una secuencia pentasacárida específica, presente en el 30 % de las moléculas de heparina farmacéuticamente activas y fisiológicamente en proteoglicanos derivados de HS presentes en la pared vascular o en la matriz extravascular⁽⁶⁴⁾. Si bien en presencia del pentasacárido específico, la inhibición de factor Xa y IXa aumenta aproximadamente 300 veces, la inhibición de trombina aumenta sólo 2 veces; mientras que en presencia de una cadena de GAGs de más de 18 disacáridos que contenga el pentasacárido, la velocidad de inhibición de trombina, factor Xa y IXa aumenta 1000 veces debido a un efecto adicional tipo templado o puente. En el modelo de templado, la molécula de AT III se une al pentasacárido específico de una cadena de GAGs y se produce el cambio conformacional que expone el sitio reactivo, por otro lado la misma cadena de GAGs une trombina a través del exosito II, y como consecuencia se acercan ambos sitios reactivos y se favorece la reacción de inhibición. Fisiológicamente, AT III-Hep o AT III-HS inhiben más eficientemente factor Xa y trombina libres que unidos a superficies celulares o a fibrina; neutralizando principalmente la generación y las acciones de trombina fuera del sitio de la injuria⁽⁶⁵⁾.





Mecanismo de activación de Antitrombina III por Heparina

A: Pentasacárido de heparina específico para la interacción con AT III.

B: Cambio conformacional de la AT III en presencia del pentasacárido de heparina (exposición del centro reactivo, RCL)

C: Esquema del mecanismo de interacción entre heparina-AT III-factor Xa y heparina-AT III-trombina (IIa

TROMBINA - COFACTOR II DE LA HEPARINA – DERMATÁN SULFATO

El cofactor II de la heparina (CH II) también pertenece a la familia de las serpinas, pero a diferencia de AT III, no es un inhibidor de proteasas de amplio espectro, sino actúa principalmente como inhibidor de trombina y meizotrombina ^(66, 67).

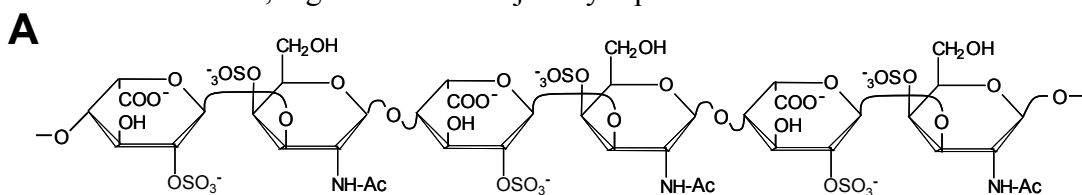
La inhibición de trombina por el CH II aumenta aproximadamente 1000 veces en presencia de heparina, heparán sulfato y dermatán sulfato. En particular, mientras la cantidad de heparina necesaria para potenciar CH II es 20 veces mayor que la necesaria para potenciar AT III, el dermatán sulfato es un potente activador de CH II y sólo tiene mínimo efecto sobre AT III ⁽⁶⁸⁾.

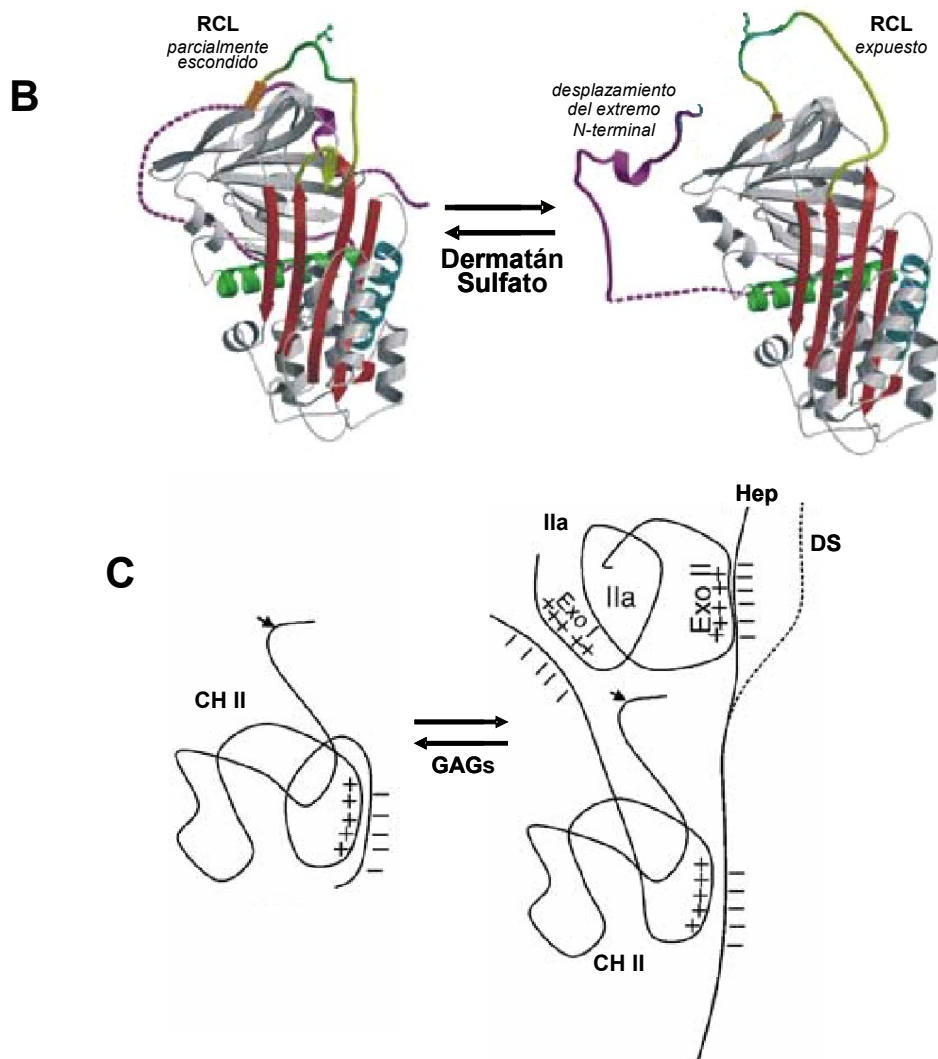
La molécula de CH II presenta en su estructura un dominio ácido N-terminal de reconocimiento de trombina, unido intra-molecularmente a un dominio electropositivo denominado sitio de unión a GAGs. En presencia de DS se produce un desplazamiento del extremo N-terminal del CH II, quedando libre para interactuar con el exosítio I de la trombina, lo que acerca ambos sitios reactivos y facilita la reacción de inhibición ⁽⁶⁹⁾. El mecanismo alostérico de potenciación de la inhibición de trombina por CH II mediado por DS no requiere de la unión del GAG a trombina, por lo tanto el complejo CH II-DS es mejor inhibidor de meizotrombina y trombina unida al coágulo que el complejo AT III-Hep o HS ⁽⁷⁰⁾.

El mecanismo de potenciación mediado por Hep sería similar al mecanismo templado propuesto para AT III, la Hep se uniría al dominio de unión a GAGs del CH II provocando el cambio conformacional responsable de la exposición del dominio ácido N-terminal y también se uniría a trombina a través del exosítio II acercando ambas moléculas.

Se ha descrito una secuencia hexasacárida específica de DS (tres repeticiones del disacárido IdoA 2S (α 1 \rightarrow 3) GalNAc-4S (β 1 \rightarrow 4) que presenta alta afinidad por el CH II, aunque se encontraría en baja proporción en DS de mamíferos y tendría menor actividad cofactor que el DS intacto. Por otro lado, se ha descrito que el CH II se uniría de manera no específica a oligosacáridos de Hep de al menos cuatro unidades de longitud, indicando que los sitios de unión Hep-CH II y DS-CH II no son idénticos ⁽⁷¹⁾.

Fisiológicamente el CH II es responsable de la inhibición extravascular de trombina, donde es potenciado por PG derivados de DS sintetizados por fibroblastos y células de músculo liso de la matriz subendotelial. Además, se han propuesto otras funciones para el CH II como participar en la regulación de trombina durante el embarazo, en la regulación de procesos inflamatorios, regeneración de tejidos y reparación tisular ^(72, 65).





Mecanismo de activación de Cofactor II de la Heparina por GAGs

A: Hexasacárido de dermatán sulfato específico para la interacción con CH II.

B: Cambio conformacional del CH II en presencia de dermatán sulfato (exposición del centro reactivo (RCL) y desplazamiento del extremo N-terminal)

C: Esquema del mecanismo de interacción entre CH II-trombina (IIa)-GAGs (heparina y dermatán sulfato).

DERMATÁN SULFATO COMO DROGA ANTITROMBÓTICA

Normalmente el DS no se encuentra en circulación, siendo casi nulos los niveles plasmáticos detectados en individuos sanos, sin embargo se han reportado niveles elevados de DS en mujeres embarazadas a término y en sus fetos ⁽⁷³⁾, en pacientes en hemodiálisis crónica ⁽⁷⁴⁾, pacientes quemados ⁽⁷⁵⁾ y pacientes sépticos ⁽⁷⁶⁾.

Como droga antitrombótica, el DS ha demostrado ser clínicamente efectivo y seguro en tratamiento y profilaxis del tromboembolismo venoso en cirugía general ⁽⁷⁷⁾, ortopédica ^(78, 79) y oncológica ^(80, 81) y en tratamiento de trombosis venosa profunda ^(82, 83), con igual o

menor incidencia de complicaciones por sangrado que la heparina. También, ha sido administrado exitosamente como anticoagulante en pacientes con trombocitopenia inducida por heparina ^(84, 85), en pacientes hemodializados ^(86, 87) y en tratamiento de coagulación intravascular diseminada en pacientes con leucemia aguda ⁽⁸⁸⁾.

Comercialmente se encuentran disponibles preparaciones de DS de alto (DSA) y bajo peso molecular (DSB), 20 a 40 kDa y 3 a 6 kDa respectivamente, siendo el DSA la isoforma nativa. Si bien, ambas formas presentan similar efecto antitrombótico cuando son administradas por vía endovenosa, se ha reportado que la biodisponibilidad de las preparaciones de alto peso molecular sería menor cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea ^(89, 90).

DERMATÁN SULFATO COMO DROGA ANTITROMBÓTICA Y PRO-FIBRINOLÍTICA

Estudios en diferentes modelos experimentales animales, han evidenciado que el DS previene la trombosis venosa con un menor efecto hemorrágico que la heparina. Por ejemplo, en un modelo de trombosis en conejos se observó que el máximo efecto antitrombótico se obtenía con 70 µg y 500 µg/kg de Hep y DS respectivamente, y que mientras un aumento de 20 veces en la dosis de Hep causaba un incremento del sangrado, un aumento de hasta 40 veces en la dosis de DS no incrementaba el sangrado ⁽⁹¹⁾. Además, en un modelo de trombosis en ratas se observó que DS causaba un 70 % de inhibición del trombo sin prolongar el tiempo de sangría, mientras que Hep y HS a dosis equipotentes presentaban una prolongación significativa del tiempo de sangría ⁽⁹²⁾.

En particular, dependiendo del estímulo de iniciación del trombo, el DS mostró ser más efectivo en inhibir la formación de fibrina por agregado de trombina que cuando se utiliza factor Xa o tromboplastina; mientras que la Hep es más efectiva cuando el estímulo inicial es factor Xa y menos efectiva cuando se utiliza tromboplastina o trombina ⁽⁹³⁾. Estas diferencias se deberían principalmente al mecanismo de acción de ambos GAGs, ya que el complejo DS-CH II es un inhibidor directo de trombina y no tiene acción sobre factor Xa. Además se ha reportado que el DS inhibe el crecimiento del trombo preexistente, alcanzando un efecto máximo de entre 70 y 90 % de inhibición de la extensión de la trombosis venosa establecida ^(94, 95), y que es más efectivo que la Hep, trabajando a actividades antitrombóticas equivalentes ⁽⁹⁶⁾. Este efecto se debería a que el complejo DS-

CH II es más efectivo que Hep-AT III en la función de inhibir trombina unida al coágulo o formando el complejo protrombinasa.

Interesantemente, además de inhibir la formación y el crecimiento del trombo, el DS ha mostrado reducir el peso de un trombo formado en función del tiempo y la dosis ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. Si bien la capacidad de reducir el tamaño del trombo podría deberse a su capacidad de inhibir el crecimiento, lo que permitiría que el sistema fibrinolítico actué sin oposición, se observó que la hirudina siendo igualmente efectiva en prevenir el crecimiento del trombo no produjo reducción de peso del mismo ⁽⁹⁷⁾. Además en un modelo de trombosis en ratas afibrinogénicas por tratamiento con ancrod, el DS retuvo su efecto antitrombótico ⁽¹⁰⁰⁾. El ancrod es un veneno de víbora *Agkistrodon rhodostoma* que produce la liberación de fibrinopéptidos A del fibrinógeno, induciendo la formación de fibrina soluble no entrecruzada que es rápidamente depurada de circulación por el sistema fagocítico-mononuclear, provocando la depleción de fibrinógeno y previniendo de manera total el crecimiento del trombo ⁽¹⁰¹⁾.

En función de estos resultados, se ha propuesto que la estimulación de la disolución del trombo mediada por DS sería por una vía alternativa, independiente del mecanismo anticoagulante. Evidencia extra a favor de un mecanismo independiente del anticoagulante surge a partir de estudios en los que la administración de inhibidores de la fibrinólisis como ácido 6-aminohexanoico (EACA), que inhibe la activación de plasminógeno, o lipopolisacáridos, que inducen la elevación de niveles de PAI-1, inhiben la reducción del peso del trombo esperada en presencia de DS ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾. En particular, estos resultados apoyarían la hipótesis de que la prevención de la formación del trombo mediada por DS podría deberse a su efecto inhibitorio de la coagulación, mientras que la reducción del peso del trombo se debería principalmente a un mecanismo independiente del anticoagulante, probablemente relacionado con el sistema fibrinolítico endógeno. Sin embargo, debido a que el tratamiento con DS no ha mostrado cambios en los niveles plasmáticos de los activadores del plasminógeno o PAI-1, tanto en modelos animales ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾ como en voluntarios humanos sanos ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾, se ha postulado que estaría involucrado un aumento localizado del proceso fibrinolítico.

En relación con un posible efecto pro-fibrinolítico localizado, Abbadini *et al.* ⁽¹⁰⁵⁾ mostró que el DS induce la liberación de t-PA de célula endotelial *in vivo* en un modelo de perfusión en ratas, y que la Hep en el mismo modelo no tenía efecto significativo. Por otro lado, resultados obtenidos en un modelo de trombosis inducida por laser, mostraron que la administración de DS inducía la lisis espontánea del coágulo y que la inyección simultánea

de DS y t-PA presentaba un efecto mayor que el obtenido en presencia de t-PA, observándose incluso un aumento en la lisis del coágulo a dosis que individualmente no habían tenido efecto significativo ⁽¹⁰⁶⁾. El efecto observado podría deberse a que el DS estimulara la liberación de t-PA de la célula endotelial favoreciendo la lisis del coágulo y representaría un efecto localizado del DS sobre la pared vascular, que podría ser considerado como una contribución adicional a su actividad antitrombótica y apoyaría la hipótesis anteriormente planteada.

Con respecto al efecto del DS sobre la producción de componentes fibrinolíticos en la célula endotelial, se ha reportado que aumenta los niveles de t-PA ⁽¹⁰⁷⁾ y reduce la expresión de PAI-1 en cultivos de célula endotelial umbilical humana (HUVEC) ⁽¹⁰⁸⁾.

Sin embargo el mecanismo exacto por el cual el DS ejercería su efecto pro-fibrinolítico aún es desconocido, si bien sería posible que el DS potenciara la disolución del trombo in vivo por estimulación de la liberación de t-PA también se ha propuesto que el DS aumentaría la activación de plasminógeno ⁽¹⁰⁹⁾. Otro mecanismo probable sería que el DS modifique la estructura de la fibrina formada, dando lugar a la formación de una red de fibrina más fácilmente lisible, aunque no hay estudios que evalúen esta última hipótesis.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

El dermatán sulfato es un glicosaminoglicano endógeno, ampliamente conocido por su acción potenciadora del cofactor II de la heparina para inhibir trombina.

Existen numerosos reportes que demuestran que el dermatán sulfato inhibe la formación del trombo y su crecimiento y también reduce el peso del trombo formado de manera dosis y tiempo dependiente. En particular, se ha reportado que la reducción del peso del trombo es independiente de la inhibición de su crecimiento y es atenuada significativamente por tratamiento con inhibidores de fibrinólisis. Por lo tanto, algunos autores han propuesto un mecanismo que involucraría al sistema fibrinolítico y sería independiente de su acción anticoagulante, aunque aún no ha sido dilucidado.

El objetivo principal de esta tesis es evaluar el efecto del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico y contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación planteada entre este glicosaminoglicano y el sistema plasminógeno-plasmina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar el efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre:

- activación de plasminógeno
- actividad de plasmina
- actividad de los activadores de plasminógeno
- formación y estructura de redes de fibrina
- lisabilidad de redes de fibrina.
- célula endotelial

MATERIALES y MÉTODOS

MUESTRAS

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron diferentes muestras obtenidas a partir de sangre venosa. En todos los casos se extrajo sangre venosa a voluntarios humanos sanos con 8 a 12 horas de ayuno. Para la evaluación de los parámetros fibrinolíticos las extracciones de sangre se realizaron, estrictamente, a individuos en reposo, entre las 8 y 9 horas de la mañana, con el menor éstasis venoso posible. A continuación se describe la obtención de las muestras sanguíneas utilizadas:

✓ **Sangre en citrato de sodio:** se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante. Estas muestras de sangre entera fueron utilizadas dentro de las 2 horas de la obtención de las mismas.

✓ **Plasma en citrato de sodio:** se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante. Posteriormente las muestras fueron sometidas a doble centrifugación a 2.000 x g durante 10 minutos para separar el plasma pobre en plaquetas.

A partir de los plasmas obtenidos se preparó una mezcla (*pool* de plasma) que fue alicuotada convenientemente y conservada a -70 °C hasta el momento de su utilización. Todas las muestras fueron descongeladas una única vez en baño termostatizado a 37 °C.

✓ **Fracción plasmática de euglobulinas:** se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante. Dentro de los 20 minutos de la obtención de las muestras, las mismas fueron sometidas a centrifugación a 2.000 x g durante 10 minutos para separar el plasma. Posteriormente se precipitó en medio ácido la fracción de euglobulinas del plasma: 9 ml de agua destilada + 0,5 ml de plasma + 0,1 ml de ácido acético 1 %, se mezcló por inversión y se dejó en heladera a 4 °C durante 30 minutos.

Luego de la precipitación, se centrifugaron los tubos a 2.000 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejaron los tubos invertidos sobre papel de filtro durante 2 minutos y luego el precipitado se disolvió en 0,5 ml de *buffer* borato (cloruro de sodio 0,15 M, borato de sodio 2,6 μM, pH 9) a 37 °C.

A partir de los precipitados obtenidos se preparó una mezcla (*pool* de euglobulinas) que fue alicuotada convenientemente y conservada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. Todas las muestras fueron descongeladas una única vez en baño termostático a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DERMATÁN SULFATO Y OTROS REACTIVOS

Para el desarrollo de los ensayos *in vitro* se utilizó dermatán sulfato (DS) de origen bovino, provisto por el Laboratorio Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina.

✓ **Dermatán sulfato puro o de alto peso molecular (DSA)**

✓ **Dermatán sulfato de bajo peso molecular (DSB)**

A continuación se detallan características de los productos utilizados según hoja de análisis del laboratorio Syntex.

Control de calidad del producto	Dermatán sulfato de alto peso molecular (DSA)	Dermatán sulfato de bajo peso molecular (DSB)
peso molecular	20 - 30 kDa	3 - 5 kDa
rotación específica	- 61 °	- 52 °
electroforesis	monobanda *	monobanda *
contenido de azufre (S)	6,2 %	5,9 %
hexosaminas	30,5 %	35,9 %
ácidos urónicos	36 %	33,8 %

* El perfil electroforético no fue afectado por tratamiento con ácido nitroso, indicando que no hay contaminación con heparina.

Además, se utilizaron otros reactivos comerciales que se detallan a continuación:

- ✓ **Plasminógeno (Plg):** Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ **Plasmina (Plm):** Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ **Sustrato cromogénico S-2251:** Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ **Activador del plasminógeno de tipo urinario o Uroquinasa (u-PA o UK):** UKIDAN (Laboratorio Serono S.A., Aubonne, Suiza) y UCB (Crinos Industria Farmacológica, Villa Guardia, Como, Italia).
- ✓ **Sustrato cromogénico S-2444:** Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ **Activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA):** t-PA recombinante (t-PA_R, Genetech Inc., San Francisco, California, EE.UU.) y t-PA de simple cadena aislado de cultivo de células de melanoma humano (t-PA, Chromogenix, Milán, Italia).
- ✓ **Estimulador de t-PA (PDF comercial):** productos de degradación de fibrin(ogeno); Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ **Estreptoquinasa (SK):** Kabi AB, Estocolmo, Suiza.

- ✓ **Trombina:** Biopool, Ventura, California, EE.UU.
- ✓ **Antisuero anti-plasminógeno:** antisuero policlonal antiplasminógeno humano de conejo; Diagnostica STAGO, Asnieres, Francia.
- ✓ **Sefarosa activada con bromuro de cianógeno:** Sigma, St. Louis, Montana, EE.UU.
- ✓ **L-Lisina:** Sigma, St. Louis, Montana, EE.UU.
- ✓ **EACA (ácido épsilon aminocaproico):** Bristol-Myers Squibb, Buenos Aires, Argentina.
- ✓ **Marcadores de peso molecular (MPM):**

HMW-SDS Marker Kit: miosina 212 kDa; α_2 -macroglobulina 170 kDa; β -galactosidasa 116 kDa; transferrina 76 kDa; glutamato deshidrogenasa 53 kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza).

Marker Kit Amersham: miosina 220 kDa; α_2 -macroglobulina 170 kDa; β -galactosidasa 116 kDa; transferrina 76-70 kDa; glutamato deshidrogenasa 53 kDa; albúmina de huevo 45 kDa; anhidrasa carbónica bovina 29 kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza).

Kaleyoscopio: miosina 207 kDa; β -galactosidasa 129 kDa; albúmina sérica bovina 85 kDa; anhidrasa carbónica 39,7 kDa; inhibidor de tripsina de soja 32 kDa (Bio-Rad, Hércules, California, EE.UU.).

Marker Kit Sigma: β -fosforilasa 97,4 kDa; albúmina bovina 66 kDa; albúmina de huevo 45 kDa; anhidrasa carbónica bovina 29 kDa (Sigma, St. Louis, Montana, EE.UU.)

El resto de los reactivos utilizados para la preparación de *buffers* y soluciones de trabajo detallados en cada experiencia, fueron de grado analítico.

- ✓ **Solución fisiológica (SF):** cloruro de sodio 150 mM.
- ✓ **Buffer fosfato-salino (PBS):** cloruro de sodio 0,15 M; fosfato monoácido de sodio 0,05 M; fosfato diácido de sodio 0,05 M; pH 7,4.

Los reactivos utilizados en las experiencias de cultivos celulares fueron provistos por Sigma (St. Louis, Montana, EE.UU.).

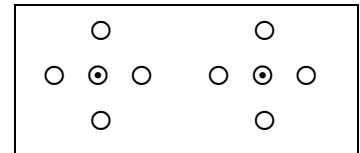
TÉCNICAS GENERALES DE LABORATORIO

A continuación se detallan un conjunto de técnicas generales de laboratorio que fueron utilizadas con distintas aplicaciones. Algunos detalles particulares de las mismas se indican en cada experiencia.

- **TÉCNICA DE OUTCHERLONY** ⁽¹¹⁰⁾

Aplicada a la determinación de actividad inmunológica de Plasminógeno

Se preparó una placa de agarosa 1,5 % p/v en solución fisiológica y se realizaron pocillos de siembra según se indica en el esquema. En los pocillos centrales “⊙” se sembró 5 µl de antisuero anti-plasminógeno y en los pocillos exteriores “○” se sembraron las muestras a investigar y un control de plasminógeno comercial. Se incubó la placa en cámara húmeda durante 48 horas en heladera (4 °C) y se evaluó la presencia de arcos de precipitación.



- **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

Se realizaron corridas electroforéticas según el método de Laemmli para separar proteínas por migración diferencial en un campo eléctrico empleando poliacrilamida como medio soporte ⁽¹¹¹⁾. La técnica original se utilizó para evaluar pureza de muestra, determinación de pesos moleculares (comparando la distancia de migración de la muestra con respecto a una mezcla de marcadores de peso molecular) e identificación de puentes disulfuros en estructuras moleculares. Mientras que, para evaluar la conversión de plasminógeno a plasmina en función del tiempo se utilizó la técnica de SDS-PAGE modificada por agregado de urea.

Materiales

1. Solución madre de acrilamida: 30: 0,8 % p/v acrilamida: bisacrilamida.
2. *Buffer* del gel separador: Tris-HCl 3 M; pH 8,8.
3. *Buffer* del gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8.
4. Solución de persulfato de amonio 10 % p/v.
5. Solución de N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED).

6. Solución de dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10 % p/v.
7. Azul Brillante de Coomassie R-250: 0,2 % p/v en solución lavadora.
8. Solución lavadora: ácido acético: metanol: agua, 1:3:6 v/v.
9. *Buffer* de separación: Tris 0,025 mM; glicina 0,192 mM; SDS 1% p/v; pH 8,3.
10. *Buffer* de muestra: 0,125 M Tris-HCl; 1% SDS p/v; gotas de azul de bromofenol y sacarosa 10 %.
11. *Buffer* de muestra con 2-mercaptoetanol (2-ME): *buffer* de muestra con 2-ME 5 % v/v.

Técnica general

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS cuyas concentraciones finales fueron: acrilamida 4 % en el gel concentrador y entre 7 y 10 % en el gel separador, *buffer* del gel separador 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, *buffer* del gel concentrador 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, persulfato de amonio 0,05 %, TEMED 0,05 %, SDS 0,1 %.

Se mezcló un volumen adecuado de muestra con *buffer* de muestra (con 2-ME si se evalúa presencia de puentes disulfuros) de tal manera que la relación proteína: SDS sea 1:5 (p/p) y se colocó en baño a 100 °C durante 1 minuto. Se sembró un volumen apropiado de muestra previamente tratada, de modo que la masa de proteínas resultara aproximadamente de 5 a 10 µg por calle para geles grandes (15 cm x 15 cm x 1 mm) y de 1 a 5 µg por calle para mini-geles (10 cm x 8 cm x 1 mm).

Los desarrollos electroforéticos se realizaron a 20 mA, hasta que la muestra atravesó el gel concentrador, y luego a 25 mA hasta que el azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel, aplicando un voltaje máximo de 450 V en los sistemas de geles grandes y 250 V en los sistemas de mini-geles.

Los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie R-250 durante 30 minutos, decolorados con solución lavadora y secados entre papel celofán para su conservación.

Modificaciones de la técnica para hacer electroforesis SDS-PAGE-Urea

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS-urea cuyas concentraciones finales fueron: acrilamida 4 % en el gel concentrador y 8,6 % en el gel separador, *buffer* del gel separador 0,375 M Tris-HCl - Urea 0,85 M - pH 8,8, *buffer* del gel concentrador 0,125 M Tris-HCl - Urea 2 M - pH 6,8, persulfato de amonio 0,05 % p/v, TEMED 0,05 % v/v, SDS 0,2 % p/v. El *buffer* de muestra utilizado fue Tris-HCl 0,125 M, SDS 1 % p/v, 2-ME 5 % v/v, Urea 8 M, gotas de azul de bromofenol y sacarosa 10 %.

Aplicación de la técnica de electroforesis en SDS-PAGE-Urea para la determinación de activación de plasminógeno a plasmina

Se incubó en baño termostático a 37 °C una solución de plasminógeno (conc. final 1,5 µM) con u-PA como activador (conc. final 300 U/ml) y aprotinina (10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La reacción de activación fue realizada en ausencia y presencia de DSA o DSB (230 µg/ml).

Se recogieron alícuotas de 10 µl de la mezcla de incubación en función del tiempo. Se mezclaron con 10 µl de *buffer* de muestra con 2-ME/SDS/Urea y se incubaron en baño a 100 °C durante 1 minuto para detener la reacción de activación.

Se sembró el total de volumen de muestra previamente tratada y se desarrolló la electroforesis a 20 mA, hasta que la muestra atravesó el gel concentrador, y luego a 25 mA, hasta que el azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel.

Los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie R-250 durante 30 minutos, decolorados con solución lavadora y secados entre papel celofán para su conservación.

Se evaluó la conversión de plasminógeno a plasmina por la desaparición de la banda del plasminógeno y la aparición de dos bandas correspondientes a la plasmina reducida.

• DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

Aplicación de un método colorimétrico para la determinación de concentración total de proteínas ⁽¹¹²⁾

Materiales

1. Reactivo cupro-alcálico: preparar en el día la mezcla de 20 ml de solución de carbonato de sodio 2 % p/v en hidróxido de sodio 0,1 M + 0,2 ml de solución de tartrato de sodio y potasio 2 % p/v + 0,2 ml solución de sulfato de cobre 1 % p/v.
2. Reactivo de Folin diluido al 50 % en agua.
3. Testigo de albúmina 1 mg/ml en solución fisiológica.

Técnica

Se prepararon diluciones de albúmina testigo de volumen final 0,6 ml y concentración entre 0,1 y 1 mg/ml (curva de calibración). Además, se preparó un tubo con 0,6 ml de solución fisiológica como blanco de reactivos y tubos con 0,6 ml de las muestras en estudio diluidas convenientemente.

A cada tubo (curva de calibración, blanco de reactivos y muestras) se agregó 3 ml de reactivo cupro-alcalino y se dejó reposar durante 10 minutos. Luego de los 10 minutos se agregó 0,3 ml de reactivo de Folin diluido, se agitó con vórtex y se dejó reposar durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 660 nm y se graficó absorbancia *versus* concentración de las soluciones de albúmina testigo para obtener la curva de calibración, de donde se interpoló la absorbancia de las muestras para obtener su concentración.

• DETERMINACIÓN DE PLASMINÓGENO

Para la determinación de plasminógeno se utilizó un método amidolítico comercial en dos etapas: Stachrom Plasminogen, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia.

En la primera etapa, se agrega un exceso de estreptoquinasa (SK) a la muestra diluida (1/10 en solución fisiológica), formándose el complejo Plg/SK que presenta actividad tipo plasmina. En la segunda etapa el complejo Plg/SK actúa sobre un sustrato cromogénico liberando 4-nitroanilina (p-NA). La concentración de p-NA determinada espectrofotométricamente a 405 nm es directamente proporcional a la concentración de Plg presente en la muestra.

• DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO

Para la determinación de fibrinógeno se utilizaron placas comerciales de inmunodifusión radial: NOR-Partigen Fibrinogen, Behringwerke AG, Marburg, Alemania.

Se sembró la muestra a investigar y una solución control (plasma, plasma 50 % y 25% diluido en solución fisiológica) y se dejó incubar en cámara húmeda durante 48 horas a temperatura ambiente. Se evaluó la presencia de arcos de precipitación cuyo diámetro está relacionado con la concentración de la muestra.

NOTA: se prefirió realizar la determinación por método inmunológico debido a que la presencia de dermatán sulfato podría interferir con el ensayo por método coagulable, conduciendo a resultados falsamente disminuidos.

• DETERMINACIÓN DE ANTITROMBINA III

Para la determinación de actividad funcional de antitrombina III (AT III) se utilizó un método amidolítico comercial: Antitrombin III, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.

En una primera etapa, se agrega una cantidad estandarizada de trombina (en *buffer* Tris-HCl-heparina) a la muestra diluida (1/50 en solución fisiológica), formándose el complejo AT III/heparina que inhibe la trombina agregada. En una segunda etapa la trombina residual actúa sobre un sustrato cromogénico liberando p-NA. La concentración de p-NA determinada espectrofotométricamente a 405 nm es inversamente proporcional a la concentración de AT III presente en la muestra.

- **DETERMINACIÓN DE COFACTOR II DE LA HEPARINA**

Para la determinación de actividad funcional de cofactor II de la heparina (CH II) se utilizó un método amidolítico comercial: Stachrom Heparin Cofactor II, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia.

En una primera etapa, se agrega una cantidad estandarizada de trombina a la muestra diluida (1/40 en *buffer* con dermatán sulfato), formándose el complejo CH II/dermatán sulfato que inhibe la trombina agregada. En una segunda etapa la trombina residual actúa sobre un sustrato cromogénico liberando p-NA. La concentración de p-NA determinada espectrofotométricamente a 405 nm es inversamente proporcional a la concentración de CH II presente en la muestra.

- **DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE FIBRINA y FIBRINÓGENO (PDF)**

Para la determinación de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) se utilizó un método comercial de aglutinación de latex: FDP-Latex Agglutination, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia.

La muestra se mezcla con partículas de latex recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para PDF y se evalúa el patrón de aglutinación por un período de 3 minutos en comparación con un control positivo y otro negativo (límite de detección = 2,5 µg/ml). El anticuerpo monoclonal provisto no tiene reacción cruzada con fibrinógeno nativo.

Para la determinación semi-cuantitativa se evalúan diluciones seriadas de la muestra en un *buffer* glicina, y el nivel de PDF se determina como el producto del límite de detección del método por la mayor dilución de la muestra que produjo reacción de aglutinación positiva. Por ejemplo si la mayor dilución de la muestra que produce aglutinación positiva es 1:32, entonces el nivel de PDF en la muestra sería mayor o igual a 80 µg/ml (2,5 µg/ml x 32).

- **DETERMINACIÓN DE DÍMERO D**

Para la determinación de dímero D se utilizó un método comercial de aglutinación de latex: DDi-Latex Agglutination Test, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia.

La muestra se mezcla con partículas de latex recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para dímero D y se evalúa el patrón de aglutinación por un período de 3 minutos en comparación con un control positivo y otro negativo (límite de detección = 0,5 µg/ml). El anticuerpo monoclonal provisto es específico para productos de degradación de fibrina entrecruzada por acción de factor XIIIa.

Para la determinación semi-cuantitativa se procede como fue detallado previamente para la determinación semi-cuantitativa de PDF considerando que el límite de detección para este ensayo es 0,5 µg/ml.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLASMINÓGENO

Se obtuvo plasminógeno a partir de plasma humano, por cromatografía de afinidad sobre lisina-sefarosa ⁽¹¹³⁾.

○ PREPARACIÓN DE LISINA-SEFAROSA

Materiales

1. Sefarosa activada con bromuro de cianógeno (sefarosa *CNBr).
2. Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 mM.
3. L-Lisina (ácido 2, 6 diaminohexanoico).
4. *Buffer* acoplante: carbonato de sodio 0,002 M; bicarbonato de sodio 0,023 M; cloruro de sodio 0,5 M; pH 8,3.
5. *Buffer* de lavado: ácido acético 0,04 M; acetato de sodio 0,009 M; cloruro de sodio 0,5 M; pH 4.
6. Bloqueante de grupos activos: etanolamina 1 M; pH 8.

Desarrollo

Se lavó 1 g de sefarosa *CNBr con 100 ml de HCl 1 mM, se suspendió y dejó hidratar durante 15 minutos, en material plástico y tapado con film. Se trabajó a pH ácido para mantener la capacidad del ligante. En esta etapa de hidratación por cada gramo de sefarosa se obtiene aproximadamente 3,5 ml de gel húmedo.

Para eliminar los conservadores se lavó y filtró la sefarosa hidratada en embudo *buchner* con 3 alícuotas de HCl 1 mM (30, 30 y 40 ml), cuidando de no reseca la sefarosa. Luego se lavó 3 veces con alícuotas de 5 ml de *buffer* acoplante y se transfirió a un tubo plástico con 5 ml de *buffer* acoplante, utilizando espátulas plásticas y respetando una relación aproximada de 1 parte de gel húmedo a 2 partes de *buffer*.

Se disolvió 30 mg de lisina en 5 ml de *buffer* acoplante. En general se recomienda utilizar una relación de 30 mg de lisina por 1 g de sefarosa seca. En esta etapa la lisina se une al gel por sus grupos α -amino, quedando los grupos ϵ -amino y α -carboxilo libres para interaccionar con la muestra.

Luego se mezcló la sefarosa con la solución de lisina en *buffer* acoplante durante 2 horas con agitación cabeza-cola y posteriormente se filtró por embudo *buchner*. El gel resultante se agitó cabeza-cola durante 2 horas con 5 ml de *buffer* bloqueante de grupos activos para

bloquear los grupos activos residuales. Posteriormente se filtró por embudo *buchner*, haciendo 3 ciclos de lavado con *buffer* acoplante (30 ml) / *buffer* de lavado (30 ml) para eliminar el exceso de *buffer* acoplante unido iónicamente. El gel se guardó en *buffer* de lavado.

• TÉCNICA DE PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Materiales

1. Gel de lisina-sefarosa en *buffer* de lavado.
2. *Buffer* inicial: fosfato monoácido de sodio 0,162 M; fosfato diácido de sodio 0,038 M; sal disódica del ácido dietilentetraminoacético (EDTA) 0,003 M; pH 7,4.
3. *Buffer* de elución: fosfato monoácido de sodio 0,162 M; fosfato diácido de sodio 0,038 M; ácido épsilon aminocaproico (EACA) 0,2 M; pH 7,4.
4. *Buffer* de lavado: fosfato monoácido de sodio 0,486 M; fosfato diácido de sodio 0,114 M; EDTA 0,003 M; pH 7,4.

Preparación de la muestra

Se diluyó 10 ml de plasma (obtenido por punción venosa utilizando citrato de sodio como anticoagulante) con 8 ml de agua y se agregó 0,02 g de EDTA.

Desarrollo

Se equilibró el gel de lisina-sefarosa con *buffer* inicial y se armó una columna de separación. En general la relación de pegado esperada es de 0,6 mg de Plg por ml de gel. Se sembró la muestra diluida recogiendo el volumen muerto de la columna en un primer tubo (V_0). Se recogieron 2 ml de eluido por tubo hasta que todo el plasma entró en la columna, obteniéndose plasma libre de Plg (P s/plg) y luego se lavó la columna con *buffer* de lavado para despegar las proteínas unidas inespecíficamente hasta que la absorbancia de la solución eluida, medida a 280 nm, resultó menor que 0,02.

Se despegó el Plg unido a la columna utilizando *buffer* de elución y recogiendo aproximadamente V_0 en el primer tubo y luego de a 1 ml hasta que la absorbancia de la solución eluida, medida a 280 nm, resultó menor que 0,02.

Cada vez se reequilibró la columna con *buffer* inicial para poder repetir el procedimiento y cada 3 ciclos de purificación se lavó la columna en *batch* con *buffer* inicial.

• PURIFICACIÓN DE PLASMINÓGENO HUMANO PLASMÁTICO

A partir de un *pool* de plasmas normales se obtuvo Plg por cromatografía de afinidad sobre lisina-sefarosa. Se utilizaron columnas de 6,5 cm de alto por 0,7 cm de diámetro, cuyo volumen muerto resultó entre 1,5 y 2 ml. El flujo de elución fue entre 8,5 y 12 ml/hora.

El plasma libre de Plg se recogió en tubos y se evaluó la ausencia de actividad inmunológica y funcional de Plg, como control de efectividad del procedimiento.

En la figura 1 se muestra como ejemplo el perfil de elución obtenido en tres columnas. En general la máxima señal de absorbancia se obtuvo en los tubos de elución número 3.

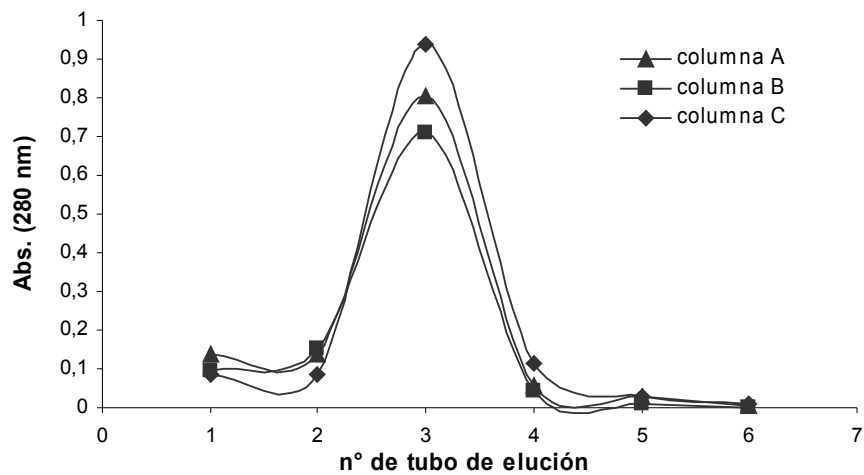


Figura 1: Perfil de elución de plasminógeno en columnas de afinidad lisina-sefarosa.

En los tubos de elución con mayores absorbancias, se confirmó actividad inmunológica frente a un anticuerpo policlonal anti-plasminógeno por la técnica de Outcherlony y se determinó actividad funcional de Plg por un método amidolítico comercial (Stachrom Plasminogen, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia). En función de esos resultados se agruparon las soluciones de Plg eluidas de las diferentes columnas preparadas para formar dos soluciones madres de Plg: Plg A correspondiente a actividad funcional de Plg > 150 % y Plg B correspondiente actividad funcional de Plg < 150 %, que fueron alicuotadas convenientemente y guardadas en freezer a -70 °C. La diferencia observada en la actividad de Plg de las soluciones obtenidas corresponde a diferencias en el rendimiento de las distintas columnas utilizadas y a que se utilizaron plasmas provenientes de diferentes individuos sanos (valor de referencia de Plg plasmático = 80-120 %).

Las soluciones de plasminógeno obtenidas (Plg A y B) fueron caracterizadas mediante la determinación de concentración proteica, actividad funcional y patrón electroforético por SDS-PAGE. A continuación se detallan los resultados obtenidos:

- ✓ **Concentración proteica:** Plg A = 0,39 mg/ml y Plg B = 0,18 mg/ml.
- ✓ **Actividad funcional de Plg:** Plg A = 243 % y Plg B = 141 %.
- ✓ **Patrón electroforético:** se realizó un fraccionamiento electroforético en SDS-PAGE para investigar el grado de pureza y comparar el perfil electroforético del Plg purificado (Plg A y Plg B) con un plasminógeno humano estándar (Chromogenix). En la figura 2 puede observarse que ambas soluciones de Plg purificado presentaron una única banda que coincide con el desplazamiento electroforético del Plg estándar.

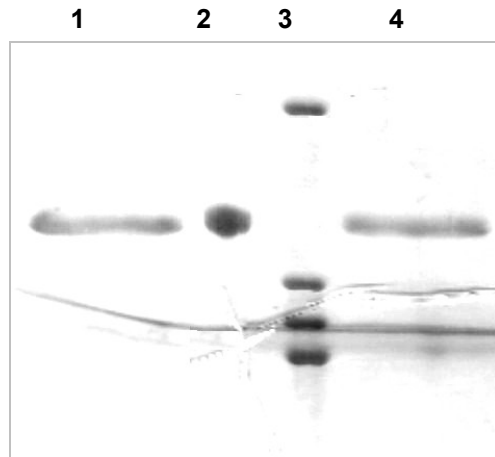
Figura 2: SDS-PAGE: Patrón electroforético de las soluciones de plasminógeno purificado.

T gel concentrador 4 %, T gel separador 10 %.

Perfiles electroforéticos de plasminógeno purificado (Plg A y Plg B) y de plasminógeno estándar (Chromogenix).

Calles:

- 1 - Plg A
- 2 - Plasminógeno estándar
- 3 - Marcadores de peso molecular
(97,4, 66, 45, 29 kDa)
- 4 - Plg B



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El proceso fibrinolítico involucra principalmente la activación de plasminógeno a plasmina mediada por los activadores de plasminógeno y la acción de la plasmina sobre la fibrina para producir la lisis del coágulo. Aunque existe una gran cantidad de proteínas moduladoras de cada una de las etapas de este proceso, se podría decir que los principales componentes involucrados en este sistema son: plasminógeno, plasmina, los activadores de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y urinario (u-PA) y fibrina.

Existen diferentes maneras de abordar el estudio del sistema fibrinolítico, como estudiar la actividad fibrinolítica global o evaluar la actividad biológica de cada uno de los componentes involucrados en este sistema. Por otro lado, el sistema fibrinolítico puede ser evaluado por métodos amidolíticos o coagulométricos. Los métodos amidolíticos se caracterizan por el uso de sustratos cromogénicos sintéticos mientras que los métodos coagulométricos utilizan geles de fibrina como sustrato final de la reacción lítica. En estos últimos las características de la arquitectura de la fibrina y las dimensiones de sus fibras tienen decisiva importancia respecto de la velocidad global del proceso de fibrinólisis. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el objetivo general de esta tesis es evaluar la acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico y, que este glicosaminoglicano tiene acción anticoagulante potenciando al cofactor II de la heparina como inhibidor de trombina, fue necesario seleccionar una metodología de estudio que permita evaluar los posibles efectos del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico de manera independiente de su efecto anticoagulante. Para ello, en esta tesis se trabajó con sistemas purificados y se utilizaron sustratos cromogénicos sintéticos específicos.

A continuación se presenta una breve reseña histórica del desarrollo de *los sustratos cromogénicos* en hemostasia, sus características generales, detalles del *mecanismo de acción de las serinoproteasas* y el trabajo de *diseño y optimización de un método amidolítico cinético para estudiar el efecto del dermatán sulfato sobre el proceso de activación de plasminógeno y sobre la actividad amidolítica de plasmina y de los activadores del plasminógeno.*

• LOS SUSTRATOS CROMOGÉNICOS

Treinta y siete años han pasado desde el nacimiento del concepto de sustratos cromogénicos en hemostasia, cuando los profesores *Birger Blömbäck*, *Margareta Blömbäck* y *Per Olsson* del Instituto/Hospital *Karolinska* de Suecia, conjuntamente con investigadores de la empresa farmacéutica *Bofors Nobelpharma* desarrollaron el primer sustrato cromogénico para trombina. Sus ideas generaron una nueva tecnología y una herramienta novedosa para la investigación y diagnóstico en hemostasia. El grupo de investigación inicialmente formado dentro de la empresa *Bofors Nobelpharma*, dio lugar a la fundación de una organización dedicada al estudio del tema denominada *Kabi Peptide Research*, que luego se llamó *Kabi Diagnóstica* y a partir de 1992 *Chromogenix*.

Si bien el uso de sustratos cromogénicos, basados en péptidos sintéticos, en hemostasia comenzó en 1970, ya en 1954 se había demostrado que algunos ésteres eran buenos sustratos para trombina ⁽¹¹⁴⁾. Sin embargo estos ésteres resultaron de limitado uso debido a que poseían baja selectividad y los productos de la reacción, alcoholes y ácidos carboxílicos, no eran fácilmente detectables. Pocos años después el desarrollo del sustrato para tripsina, 4-nitroanilida N-benzoil arginina (BAPNA), considerado el primer sustrato cromogénico para serinoproteasas fue un avance significativo en el diseño de sustratos sintéticos⁽¹¹⁵⁾. La hidrólisis de BAPNA liberaba p-NA, detectable espectrofotométricamente, de manera proporcional a la actividad de tripsina, aunque su uso para evaluar la actividad proteolítica en fluidos biológicos fue limitado debido a su baja selectividad. En 1972 el Dr. *Blömbäck* y su equipo, conjuntamente con el grupo *Bofors Nobelpharma* presentaron el primer sustrato cromogénico para trombina, denominado S-2160 (benzoil-Phe-Val-Arg-pNA) ⁽¹¹⁶⁾. Pocos años después, su estructura fue modificada para dar lugar al sustrato S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA; Pip: ácido pipercolínico, homólogo de L-Pro) que es actualmente el sustrato de elección para evaluar actividad trombínica. Posteriormente, a medida que fueron describiéndose los eventos proteolíticos asociados a la activación del sistema de coagulación y fibrinolítico, se desarrollaron múltiples sustratos cromogénicos, de gran utilidad para investigación y diagnóstico en hemostasia.

Los sustratos cromogénicos son péptidos que reaccionan con enzimas proteolíticas específicas generando desarrollo de color. Son productos sintéticos diseñados para presentar selectividad similar a la de los sustratos naturales de las enzimas. El cromóforo

más ampliamente utilizado en sustratos diseñados para la determinación de proteasas involucradas en coagulación y fibrinólisis es p-NA. En solución acuosa la p-NA presenta un máximo de absorción a 380 nm, mientras que unida al sustrato absorbe por debajo de 300 nm. La hidrólisis del enlace péptido/p-NA en el sustrato cromogénico por acción proteolítica de una enzima, resulta en la liberación de p-NA y el desarrollo de color amarillo en la solución donde tiene lugar la reacción. La señal espectrofotométrica, es directamente proporcional a la actividad enzimática y generalmente se mide a 405 nm para evitar interferencias del sustrato no hidrolizado. El alto coeficiente de absorción molar de la p-NA en solución acuosa ($\epsilon_{405 \text{ nm}} = 9650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) permite su detección en bajas concentraciones, aumentando la sensibilidad de los sustratos cromogénicos para determinar actividad enzimática.

En homeostasia la mayoría de las técnicas utilizadas para determinar actividad enzimática emplean métodos coagulométricos (miden tiempo de coagulación, tiempo de lisis, áreas de lisis) o inmunológicos (miden cantidad de masa). El uso de sustratos cromogénicos para determinar actividad enzimática se conoce con el nombre de método amidolítico. Los métodos amidolíticos en general pueden detectar actividades enzimáticas muy bajas, sin embargo se debe tener presente que los sustratos cromogénicos tienen menos selectividad y especificidad que los sustratos naturales y algunas veces no existe correspondencia entre la reactividad del sustrato natural y el sintético frente a una misma preparación enzimática.

La selectividad es una propiedad del sustrato e indica el grado en que el sustrato se une y es clivado proteolíticamente por diferentes enzimas. Un sustrato sintético en general puede ser clivado por más de una enzima, mientras que un sustrato natural es preferentemente clivado por una enzima particular. Esto se debe a que la interacción entre la enzima y el sustrato natural depende en general de interacciones entre dominios exteriores específicos además del sitio activo, mientras que el sustrato sintético sólo interacciona con el sitio activo de la enzima.

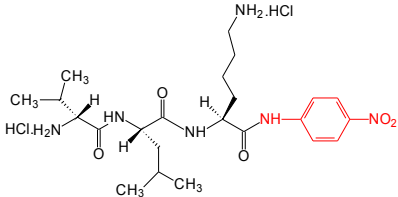
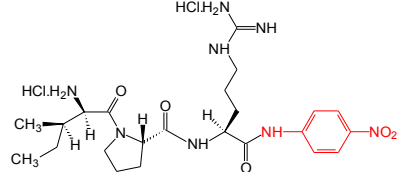
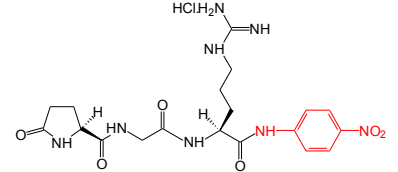
La especificidad es una propiedad de la enzima y describe cuán restrictiva es en la selección del sustrato. Por ejemplo, la especificidad de las serinoproteasas en general no es muy elevada ya que poseen el mismo sitio activo y mecanismo de acción. El factor más importante que condiciona la estructura de un sustrato para interaccionar específicamente con una enzima es la secuencia de aminoácidos próxima al enlace de clivaje específico.

La adecuada selección de condiciones de operación como el tipo de *buffer*, pH, temperatura, concentración relativa de muestra y reactivos y/o selección de tiempos de incubación es fundamental para optimizar la selectividad y especificidad de la reacción en

estudio. La velocidad de hidrólisis de un sustrato cromogénico es dependiente de la temperatura de trabajo, por ejemplo un aumento de temperatura en 1 °C genera un aumento en la velocidad de reacción de 2,5 a 7,5 %. Por lo tanto, es fundamental mantener la temperatura constante durante todo el tiempo de operación y entre diferentes experiencias para tener resultados comparables. El pH de reacción debe ser elegido en función del pH óptimo para la actividad proteolítica de la enzima en estudio. Como *buffer* de trabajo es muy común utilizar Tris-HCl ya que el pKa del *buffer* Tris es 8,1 (25 °C), pudiendo ajustarse el pH de reacción entre 7,3 y 9,3, rango en el que la mayoría de las serinoproteasas presentan actividad enzimática óptima.

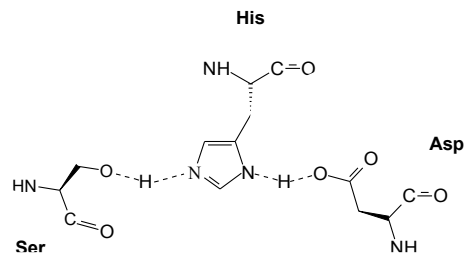
Es importante destacar que la tecnología de sustratos cromogénicos ha sido ampliamente utilizada para generar conocimientos fundamentales sobre mecanismos de regulación del sistema de coagulación y fibrinolítico. En particular, actualmente es aplicada al diagnóstico en el laboratorio clínico y como una herramienta importante en la investigación básica.

Como ejemplo de aplicación de sustratos cromogénicos al estudio del sistema fibrinolítico, existen sustratos específicos para medir actividad de plasmina, activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y activador de plasminógeno de tipo urinario (u-PA). Los sustratos específicos de plasmina también pueden ser utilizados para la determinación indirecta de plasminógeno, inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), inhibidor de plasmina y fibrina soluble ⁽¹¹⁷⁾.

Enzima (sitio activo)	Sustrato natural (↓ enlace sensible)	Sustrato cromogénico	
Plasmina Ser 741 Asp 646 His 603	Fibrina COOH-Lys ↓ X	S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)	
t-PA Ser 478 Asp 371 His 322	Plasminógeno Pro 559 - Gly 560 - Arg 561 ↓ Val 562 -	S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA)	
u-PA Ser 356 Asp 255 His 204	Val 563 - Glu 564	S-2444 (pyro-Glu-Gly-Arg-pNA)	

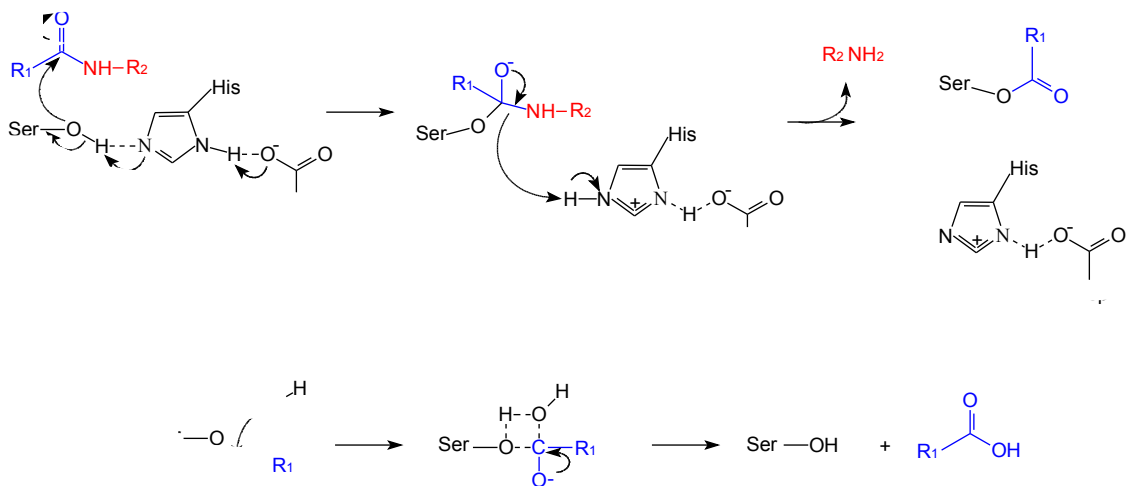
• **MECANISMO DE ACCIÓN DE SERINOPROTEASAS SOBRE SUSTRATOS CROMOGENICOS**

La mayoría de las serinoproteasas presentan dos regiones funcionales: la porción catalítica (sitio activo Ser-Asp-His) y la porción de reconocimiento de sustrato natural (estructuras *kringles*, dominios *finger*, dominios EGF y dominios de carboxilación dependientes de vitamina K).



***Estructura de la tríada catalítica característica de las serinoproteasas.
Ser (serina) – His (histidina) – Asp (ácido aspártico)***

La reacción de la serinoproteasa sobre el sustrato cromogénico depende de la interacción entre el sustrato y la estructura de cargas asociada al sitio activo de la enzima (el grupo hidroxilo de la serina, el grupo imidazol de la histidina y el grupo carboxilo del ácido aspártico) que interaccionan entre sí a través de enlaces hidrógeno.



***Mecanismo proteolítico de serinoproteasas frente al sustrato cromogénico.
R₁CONHR₂ = sustrato cromogénico; R₂NH₂ = p-NA***

En una primera etapa se forma un complejo no covalente entre la enzima y el sustrato. Luego se produce un ataque nucleofílico del hidroxilo-serina de la enzima sobre el grupo carbonilo-amida del sustrato que da lugar a la ruptura del enlace amida, formación de un intermediario acil-enzima y liberación de p-NA del sustrato.

En el paso siguiente, etapa limitante de la reacción, el enlace éster del intermediario acil-enzima es hidrolizado, regenerándose la enzima libre que puede actuar sobre otra molécula de sustrato.

• DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO AMIDOLÍTICO-CINÉTICO PARA EVALUAR ACTIVIDAD DE COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Se utilizaron sustratos cromogénicos sintéticos y sistemas purificados para estudiar la actividad biológica de cada uno de los componentes involucrados en el sistema fibrinolítico. En particular, esta metodología de estudio permite evaluar los posibles efectos del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico, independizándose de sus efectos anticoagulantes debido a que se reemplaza la fibrina, como sustrato de la actividad lítica de plasmina, por el sustrato sintético S-2251.

En esta tesis se realizaron ensayos comparativos de actividad enzimática en presencia y ausencia de dermatán sulfato. Para ello se diseñó un método amidolítico cinético y a continuación se detalla la optimización de esta metodología y el modo de análisis de los resultados:

A.- Estudio de la activación de plasminógeno

A₀- Optimización de las condiciones experimentales generales

A₁- Activación de plasminógeno por u-PA

A₂- Activación de plasminógeno por t-PA

A₃- Activación de plasminógeno por estreptoquinasa

B.- Estudio de la actividad amidolítica de plasmina

C.- Estudio de la actividad amidolítica de u-PA

D.- Análisis de los resultados

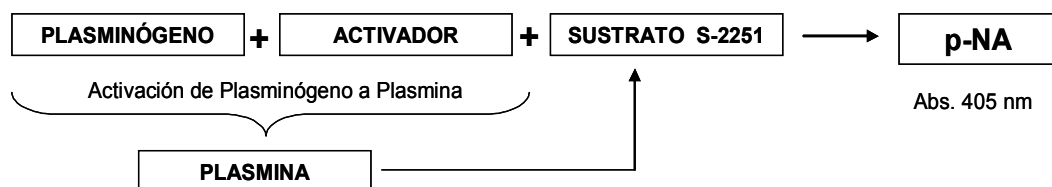
A.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO

Fisiológicamente, el Plg es convertido en la enzima activa Plm, por acción de los activadores de plasminógeno t-PA o u-PA. El t-PA actúa mayoritariamente en el sistema vascular y es el principal agente responsable de la disolución del trombo vía la activación del Plg, unido a fibrina, a Plm; mientras que u-PA se encuentra principalmente en tejido conectivo y participa en la migración celular y la remodelación de los tejidos. Además, mientras que la activación de Plg mediada por t-PA es potenciada en presencia de fibrina, la activación por u-PA es apenas influenciada por fibrina ⁽¹¹⁸⁾.

En esta tesis se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de Plg mediada por los activadores fisiológicos t-PA y u-PA y además, por un activador exógeno de uso terapéutico denominado estreptoquinasa. Se eligió trabajar con estos activadores ya que como tienen diferentes mecanismos de acción, el análisis conjunto de los resultados podría permitir la identificación de un patrón de comportamiento del dermatán sulfato en esta etapa.

A₀.- OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES

La reacción de activación de plasminógeno se realizó en policubetas de poliestireno incubando Plg con un activador de plasminógeno y el sustrato cromogénico S-2251 y registrando la absorbancia a 405 nm en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de la Plm formada, de modo que del gráfico de absorbancia *versus* tiempo puede evaluarse la cinética de activación de Plg.



Esquema general del ensayo amidolítico de activación de plasminógeno

En una primera etapa se definieron las fuentes de plasminógeno/plasmina y sustrato cromogénico a utilizar, el equipo espectrofotométrico y se optimizaron las condiciones de

reacción como temperatura, *buffer*, pH, concentración de plasminógeno y sustrato cromogénico.

NOTA: todas las concentraciones indicadas son concentraciones finales en el medio de reacción (conc. finales).

Fuentes de plasminógeno y plasmina

- ✓ Plasminógeno purificado a partir de plasma normal humano.
- ✓ Plasminógeno humano; Chromogenix, Milán, Italia.
- ✓ Plasmina humana; Chromogenix, Milán, Italia.

Sustrato cromogénico sintético

Sustrato específico para plasmina: S-2251, Chromogenix, Milán, Italia.

Equipo espectrofotométrico

Lector de ELISA: Reader 100, Organon Teknica, Miami, EE.UU.

Temperatura

Todos los reactivos fueron estabilizados a 37 °C antes de comenzar el ensayo y el monitoreo de absorbancia se llevó a cabo en un cuarto estufa (35-37 °C).

Medio de reacción: *buffer*, pH

Con el objetivo de establecer el efecto de la fuerza iónica y el pH en la reacción de activación de plasminógeno, se evaluaron diferentes medios de reacción: agua, solución fisiológica (osmolaridad similar a la sanguínea) y *buffer* Tris-HCl pH 8 (*buffer* recomendado para estudios con sustratos cromogénicos) en distintas concentraciones.

En la figura 3 puede observarse que la reacción de activación se encuentra disminuida en *buffer* Tris diluido y no se produce en agua o solución fisiológica, mientras que es óptima en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.

Estas diferencias se deberían, principalmente, a que tanto en agua como en solución fisiológica o en *buffer* Tris diluido (1/10 y 1/20) el pH final de la reacción resultó aproximadamente 5 (pH del agua destilada disponible en el laboratorio y de la mayoría de las soluciones preparadas sin ajuste ácido-base). Por otro lado, la fuerza iónica del medio parece ser un factor importante en el desarrollo de la reacción, ya que en presencia de

concentraciones diluidas de Tris o mezclas de *buffer* Tris y solución fisiológica la reacción resultó alterada.

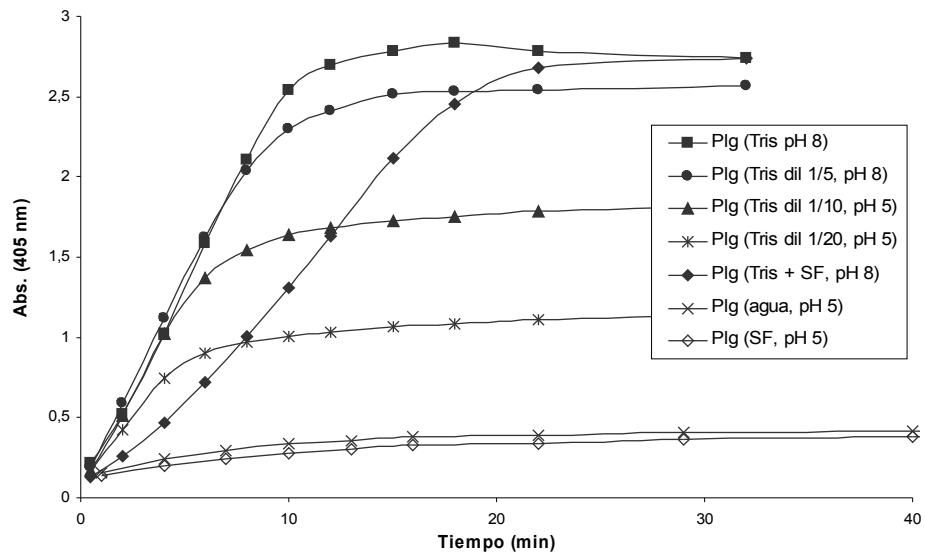


Figura 3: Optimización de las condiciones experimentales de la reacción de activación de plasminógeno (medio de reacción).

Plg 0,5 μ M; u-PA 100 U/ml; S-2251 1 mM.

Plg = plasminógeno, Tris = *buffer* Tris-HCl 50 mM. Dil = dilución, SF= solución fisiológica. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

En función de estos resultados preliminares se diseñó una experiencia para evaluar la reacción de activación de Plg frente al sustrato S-2251. Con el objetivo de definir las condiciones de trabajo, se ajustó el medio de reacción con *buffer* Tris-HCl 50 mM o solución fisiológica a pH 7,4 (pH fisiológico) o pH 5. En la figura 4 puede observarse que la reacción de activación de Plg fue óptima a pH 7,4 y no ocurrió a pH 5. Además, resultó levemente superior en *buffer* Tri-HCl respecto de solución fisiológica.

Con el objetivo de identificar las variables que afectan la activación de Plg propiamente dicha y/o la actividad sobre el sustrato S-2251 de la Plm formada se evaluó la actividad de Plm estándar en las mismas condiciones experimentales. En la figura 5 puede observarse que la actividad de Plm fue óptima a pH 7,4 y disminuyó a pH 5. Además, fue similar en *buffer* Tri-HCl respecto de solución fisiológica a pH 7,4.

Por lo tanto, se decidió trabajar a pH fisiológico, en *buffer* Tris-HCl 50 mM debido a que ambas reacciones resultaron óptimas en ese medio y además, el control del pH y las condiciones del medio de trabajo resultaron más eficientes.

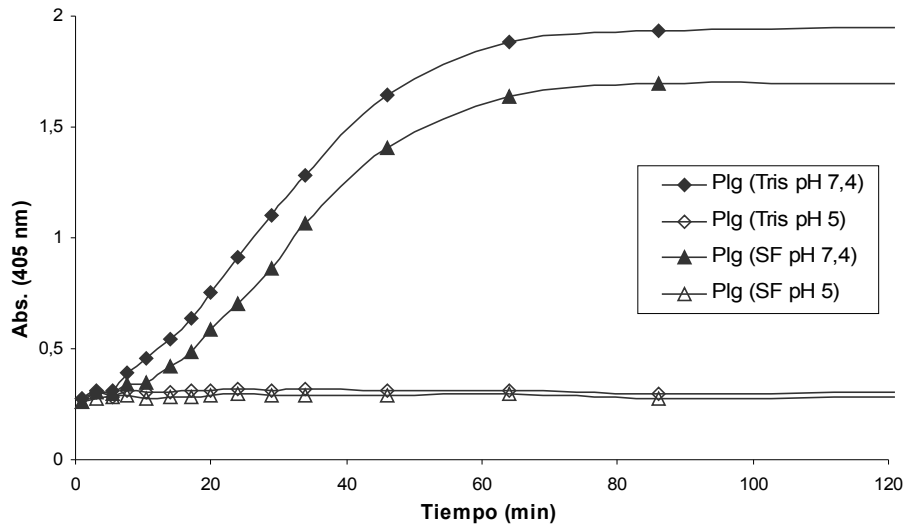


Figura 4: Optimización de las condiciones experimentales de la reacción de activación de plasminógeno (medio de reacción).

Plg 0,5 μ M; u-PA 40 U/ml; S-2251 1 mM.

Plg = plasminógeno, Tris = *buffer* Tris-HCl 50 mM. SF= solución fisiológica. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

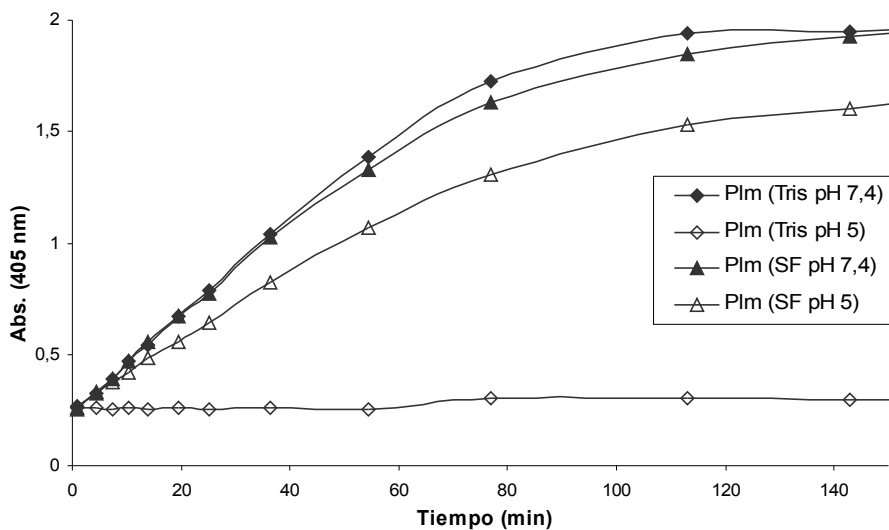


Figura 5: Optimización de las condiciones experimentales del ensayo de actividad de plasmina (medio de reacción).

Plm 0,25 μ M; S-2251 1 mM.

Plm = plasmina, Tris = *buffer* Tris-HCl 50 mM. SF= solución fisiológica. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Concentración de plasminógeno y sustrato cromogénico

Una vez seleccionado el *buffer* y pH de trabajo se ajustó la concentración de S-2251 y plasminógeno. Las concentraciones evaluadas fueron entre 0,5 y 1 mM para S-2251 y entre 0,15 y 0,5 μ M para Plg.

En la figura 6 puede observarse que a mayor concentración de sustrato cromogénico aumentaron el máximo de absorbancia alcanzado y la pendiente de la curva de activación. Además, es importante destacar que en todos los casos pueden diferenciarse las curvas de activación a diferentes concentraciones de Plg indicando que, en las condiciones experimentales utilizadas, ningún reactivo actuó como limitante de la reacción (figura 7). Por otro lado, se comprobó que el Plg no tiene acción directa sobre el sustrato S-2251, ya que el blanco realizado con la concentración máxima de Plg utilizada en el ensayo (0,46 μM) no mostró cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia (figura 7). Por lo tanto, se seleccionó 0,3 μM como la concentración de Plg de trabajo para estudiar la reacción de activación por los diferentes activadores y 0,5 mM como la concentración de sustrato cromogénico.

Resumiendo, las condiciones experimentales optimizadas para evaluar el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno resultaron:

- Temperatura 37 °C. Todos los reactivos fueron estabilizados a 37 °C antes de comenzar el ensayo y el monitoreo de absorbancia se llevó a cabo en un cuarto estufa (35-37 °C).
- *Buffer* Tris-HCl: concentración final 50 mM pH 7,4.
- Plasminógeno: concentración final 0,3 μM .
- Sustrato cromogénico S-2251: concentración final 0,5 mM.

Una vez definidas estas condiciones experimentales generales utilizando u-PA como activador de Plg, se optimizó en forma particular el ensayo de activación de Plg con cada uno de los activadores mencionados. Además, se evaluaron condiciones de reacción especiales para el ensayo de activación de Plg por t-PA (ensayo en presencia de fibrina) y se preparó un estimulador soluble de t-PA (producto de degradación de fibrina y fibrinógeno).

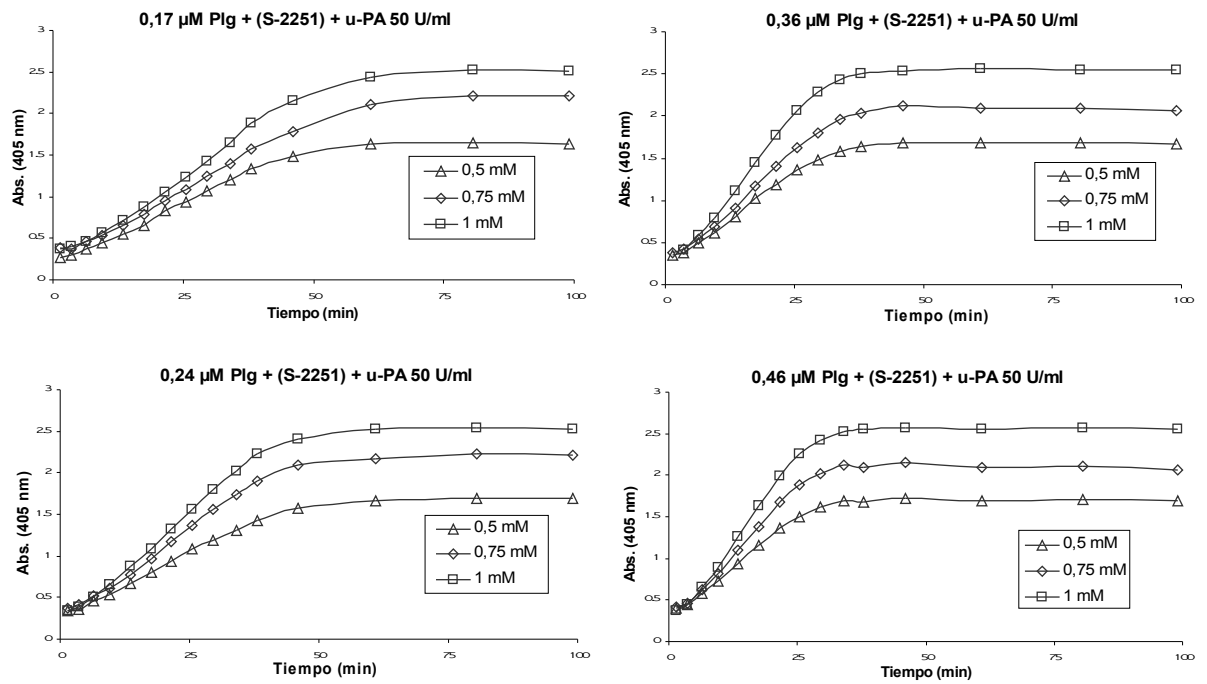


Figura 6: Optimización de las condiciones experimentales de la reacción de activación de plasminógeno (concentración de plasminógeno y sustrato cromogénico).
 Plasminógeno (Plg, entre 0,15 y 0,5 μM); u-PA 50 U/ml; S-2251 (entre 0,5 y 1 mM); *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones

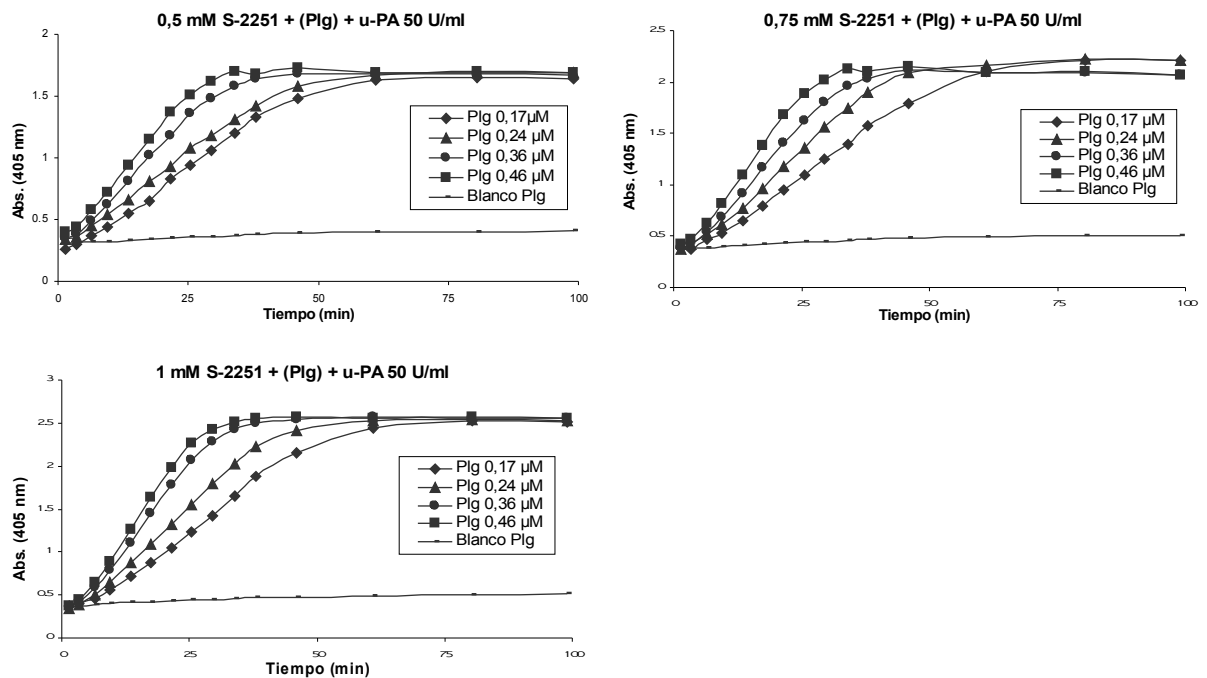


Figura 7: Optimización de las condiciones experimentales de la reacción de activación de plasminógeno (concentración de plasminógeno y sustrato cromogénico).
 Plasminógeno (Plg, entre 0,15 y 0,5 μM); u-PA 50 U/ml; S-2251 (entre 0,5 y 1 mM); *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.
 Blanco de Plg = Plg 0,46 μM ; S-2251 (entre 0,5 y 1 mM); *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

A1.- ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR u-PA

El activador de Plg de tipo urinario (u-PA) o uroquinasa (UK) pertenece a la familia de las serinoproteasas y tiene la capacidad de clivar el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del Plg para convertirlo en la enzima activa Plm.

Este activador es sintetizado como proenzima (scu-PA: *single chain* u-PA) y convertido a la forma activa por clivaje del enlace Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ (tcu-PA: *two chain* u-PA) por acción de Plm, factor XII o calicreína. La forma activa (también llamada HMW-UK: *high molecular weight* UK) se encuentra en grandes cantidades en orina humana (40 a 80 µg/l), donde la Plm puede producir el clivaje del enlace Lys₁₃₅-Lys₁₃₆, pérdida del dominio *kringle* y EGF, generando una molécula de menor peso molecular (LMW-UK: *low molecular weight* UK) con actividad enzimática preservada.

Si bien HMW-UK es aproximadamente dos a tres veces más potente que LMW-UK en ensayos biológicos (lisis del coágulo), ambas formas presentan reactividad similar como activadores de Plg *in vitro* utilizando el sustrato sintético S-2251 ⁽¹¹⁹⁾.

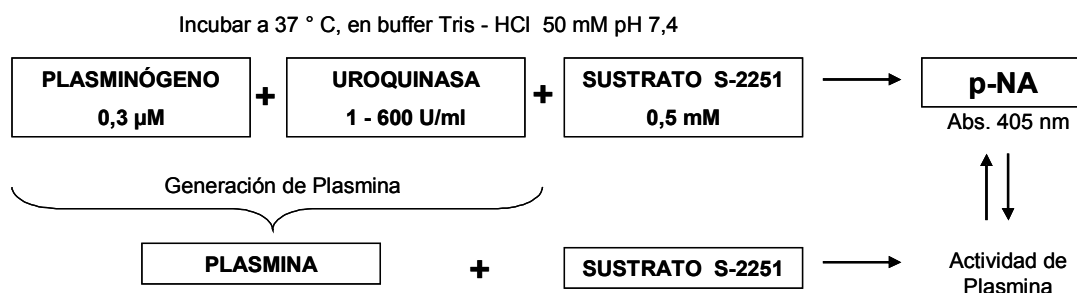
Se utilizaron dos marcas comerciales de u-PA:

- ✓ UKIDAN (Laboratorio Serono S.A., Aubonne, Suiza)
- ✓ UROQUINASA-UCB (Crinos Industria Farmacológica, Villa Guardia, Como, Italia)

Ensayo de activación de plasminógeno por u-PA

La reacción de activación de plasminógeno por u-PA se realizó en policubetas de poliestireno incubando Plg (0,3 µM) con distintas concentraciones de u-PA (entre 1 y 600 U/ml) y el sustrato cromogénico S-2251 (0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo.

Como blanco de reacción se incubó u-PA/S-2251 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación.



Esquema general del ensayo amidolítico de activación de plasminógeno por u-PA

En una primera etapa se compararon las curvas de activación de Plg utilizando los dos reactivos de u-PA comerciales, en concentraciones de 1, 10, 50 y 100 U/ml. En la figura 8 puede observarse que ambos reactivos presentaron la misma actividad, medida a través del ensayo amidolítico de activación de Plg, pudiéndose utilizar indistintamente como fuentes de u-PA.

Para evaluar el efecto del dermatán sulfato sobre el proceso de activación de Plg, se estudió la reacción en presencia de diferentes concentraciones de u-PA (entre 1 y 600 U/ml) para determinar la concentración adecuada (figura 9). Puede observarse que a concentraciones de u-PA mayores que 50 U/ml el proceso de activación fue instantáneo obteniéndose máximos de generación de Plm a tiempos menores de 15 minutos de incubación. Mientras que, a concentraciones de u-PA menores que 50 U/ml, existió una fase de latencia asociada a la activación de Plg a Plm. Además, se confirmó que el u-PA no tiene acción directa sobre el sustrato S-2251 ya que el blanco realizado con la concentración máxima de u-PA utilizada en el ensayo (600 U/ml) no mostró cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia.

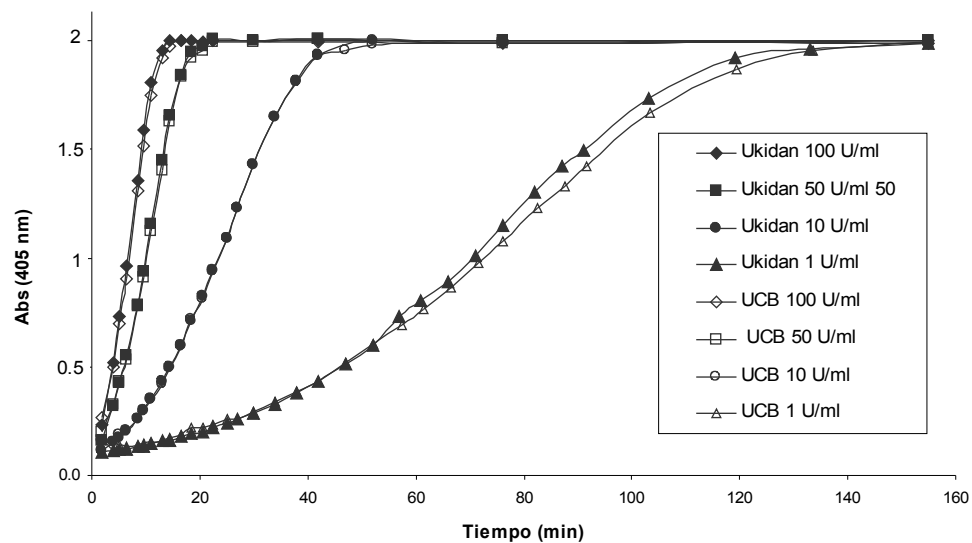


Figura 8: Ensayo de activación de plasminógeno utilizando diferentes marcas comerciales de uroquinasa.

Plasminógeno 0,3 μ M; u-PA (entre 1 y 100 U/ml); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Ukidan = uroquinasa Ukidan, Laboratorio Serono S.A., Aubonne, Suiza.

UCB = uroquinasa UCB, Crinos Industria Farmacológica, Villa Guardia, Como, Italia.

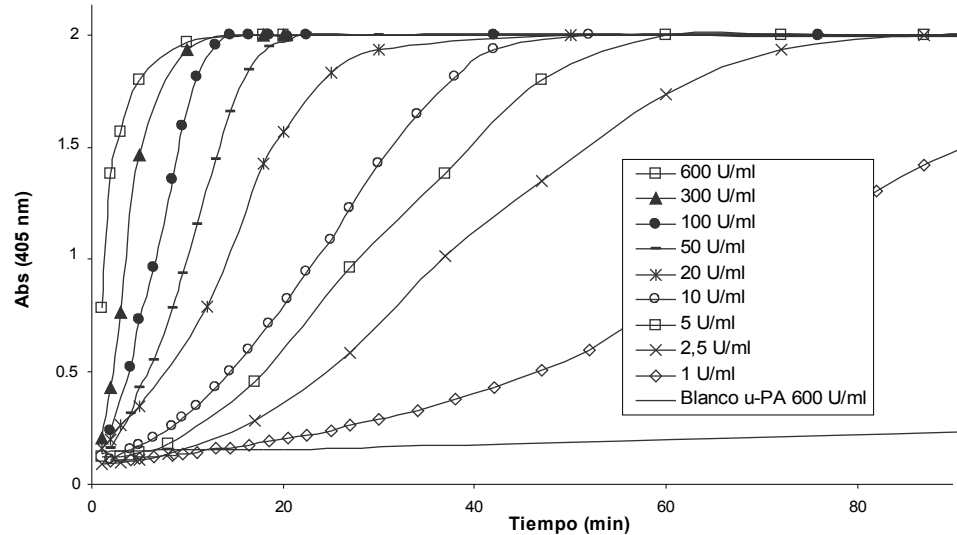


Figura 9: Ensayo de activación de plasminógeno utilizando distintas concentraciones de uroquinasa.

Plasminógeno 0,3 μ M; u-PA (entre 1 y 600 U/ml); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Blanco de u-PA = u-PA 600 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno por u-PA

Para evaluar la activación de Plg en presencia de distintas concentraciones de DSA y DSB (4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 μ g/ml) se decidió utilizar una concentración de u-PA de 10 U/ml. La reacción de activación de Plg por u-PA se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: Plg (conc. final 0,3 μ M) + sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) + distintas concentraciones de DS (conc. final: 0 a 512 μ g/ml) + u-PA (conc. final 10 U/ml), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de u-PA.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 μ g/ml) sobre la reacción de activación de Plg utilizando diferentes concentraciones de u-PA (5, 10 y 50 U/ml).

A₂- ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR t-PA

El activador de Plg de tipo tisular (t-PA) es el principal activador fisiológico del sistema fibrinolítico, responsable de la remoción de fibrina del árbol vascular. El t-PA pertenece a la familia de las serinoproteasas y tiene la capacidad de clivar el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del Plg para convertirlo en la enzima activa Plm. Puede presentarse como una proteína de una sola cadena (sct-PA: *single chain tisular plasminogen activator*) polipeptídica de 572

residuos aminoacídicos de peso molecular 72 kDa o como una molécula de dos cadenas (tct-PA: *two chain tisular plasminogen activator*) unidas por puente disulfuro que se obtienen por acción de Plm o calicreína que hidrolizan el enlace Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ del sct-PA.

Las dos formas del activador, sct-PA y tct-PA, presentan igual actividad fibrinolítica en sistemas purificados compuestos de Plg y fibrina ⁽¹²⁰⁾. Además, ambos activadores presentan afinidades muy bajas por el Plg en ausencia de fibrina. La fibrina aumenta la velocidad de reacción de activación de Plg por ambas formas de t-PA, actuando como sustrato de Plm y como catalizador de la interacción entre t-PA y Plg (catálisis heterogénea). La fibrina se uniría al t-PA y luego el Plg también se uniría formando un complejo ternario cíclico sobre la fibrina. A medida que la fibrina es degradada se forman nuevos sitios de unión con mayor afinidad para el t-PA y también permitiría la unión de más moléculas de Plg. Este mecanismo constituye un *feed back* positivo para el sistema fibrinolítico y asegura la activación del Plg localizado sobre el coágulo de fibrina.

Se evaluaron dos tipos de t-PA:

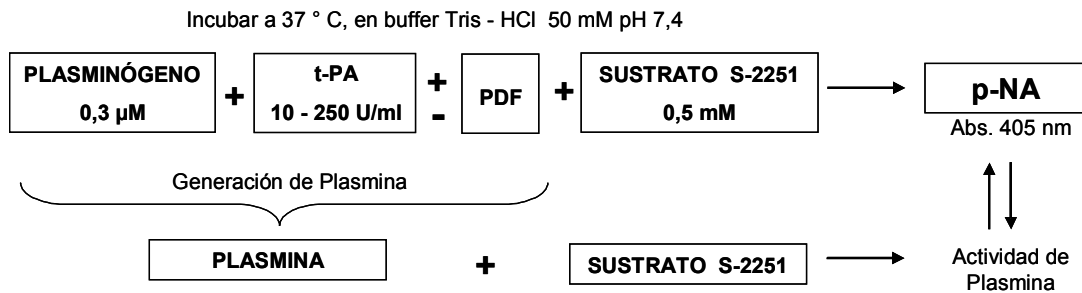
- ✓ t-PA recombinante (t-PA_R), Genetech Inc., San Francisco, California, EE.UU.
- ✓ t-PA de simple cadena aislado de cultivo de células de melanoma humano (t-PA; > 90 % sct-PA), Chromogenix, Milán, Italia.

Ensayo de activación de plasminógeno por t-PA

La reacción de activación de plasminógeno por t-PA se realizó en policubetas de poliestireno incubando Plg (0,3 μM) con distintas concentraciones de t-PA (entre 10 y 250 U/ml) y el sustrato cromogénico S-2251 (0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo.

Como blanco de reacción se incubó t-PA/S-2251 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación.

Además, se evaluó la reacción de activación de Plg en presencia de un estimulador de t-PA disponible comercialmente. Este producto comercial es una mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) provisto por Chromogenix, Milán, Italia.



Esquema general del ensayo amidolítico de activación de plasminógeno por t-PA.

En una primera etapa se compararon las curvas de activación de Plg utilizando t-PA recombinante (t-PA_R) o humano (t-PA).

En la figura 10 se muestran las curvas de activación de Plg utilizando t-PA recombinante, en concentraciones entre 10 y 250 U/ml. Puede observarse que la reacción de activación de Plg por t-PA_R en ausencia de fibrina fue muy lenta, con una fase de latencia mayor a 150 minutos para todas las concentraciones de t-PA_R utilizadas. Luego de 150 minutos de incubación se agregó al ensayo de activación el estimulador comercial de t-PA (PDF comercial) y pudo observarse que luego de su agregado aumentó la velocidad de generación de Plm. En la misma figura puede observarse que el t-PA_R no tiene acción directa sobre el sustrato S-2251 ya que el blanco realizado con la concentración máxima de t-PA_R utilizada en el ensayo (250 U/ml), no mostró cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia. Además, el agregado de PDF comercial no modificó el blanco de reacción, indicando que no presenta actividad sobre el sustrato S-2251.

En la figura 11 se muestran las curvas de activación de Plg utilizando t-PA humano, en concentraciones entre 25 y 200 U/ml. Comparando las figuras 10 y 11 puede observarse que la actividad de t-PA humano fue mayor que el t-PA_R y que éste, aún en ausencia de fibrina, produjo activación de plasminógeno. Además, en la figura 11 puede observarse que el agregado de PDF comercial aumentó la velocidad de generación de Plm y que el t-PA humano no tiene acción directa sobre el sustrato S-2251 (blanco t-PA 200 U/ml).

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió trabajar con t-PA humano en los sucesivos ensayos de activación de Plg. Además, se planteó como nuevo objetivo preparar un producto estimulador de t-PA soluble para estudiar la reacción de activación de Plg por t-PA en presencia de fibrina y posteriormente evaluar el efecto del dermatán sulfato sobre este proceso de activación.

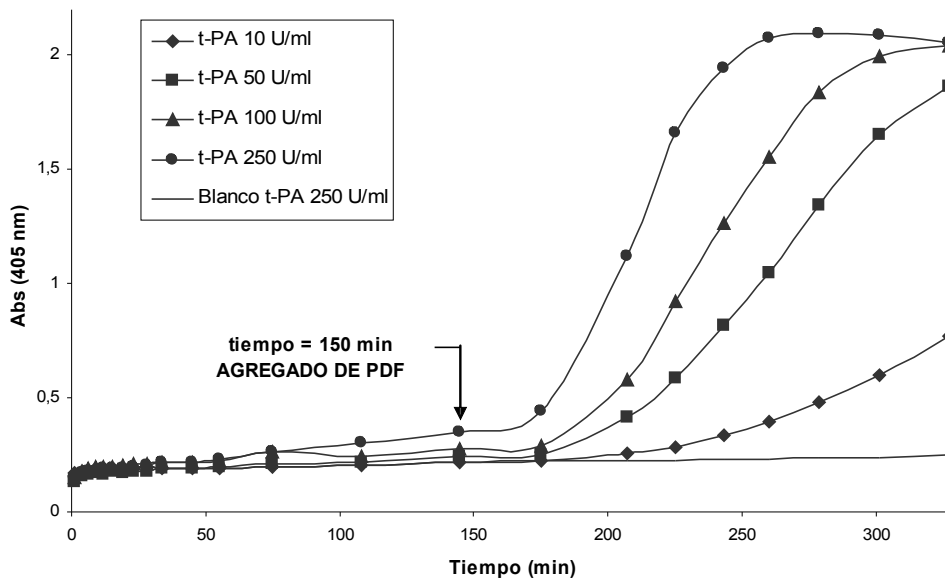


Figura 10: Ensayo de activación de plasminógeno utilizando distintas concentraciones de t-PA recombinante.

Plasminógeno $0,3 \mu\text{M}$; t-PA_R (entre 10 y 250 U/ml); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Luego de 150 min de incubación se agregó $10 \mu\text{l}$ de un estimulador de t-PA comercial (PDF, producto de degradación de fibrina y fibrinógeno).

Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Blanco t-PA = t-PA_R 250 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

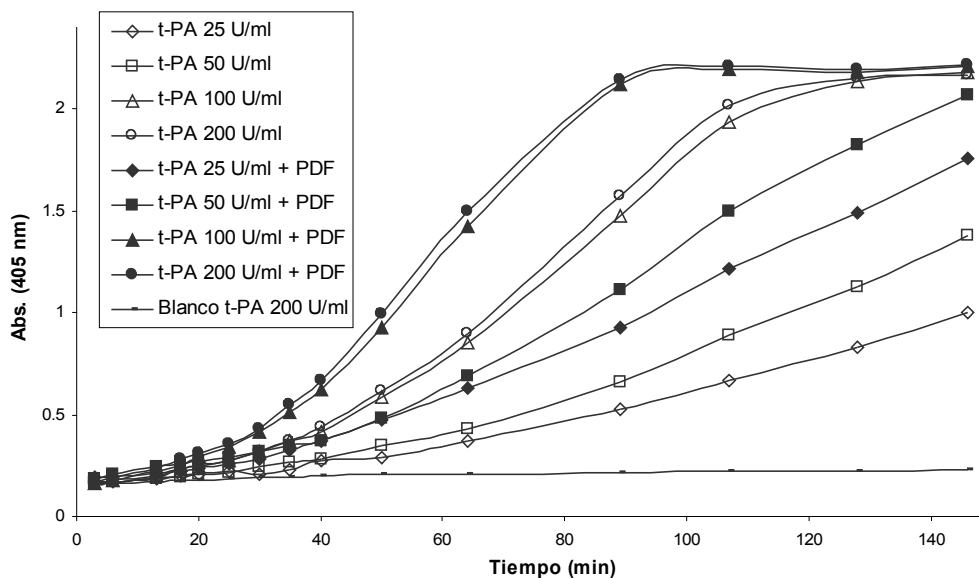


Figura 11: Ensayo de activación de plasminógeno utilizando distintas concentraciones de t-PA humano.

Plasminógeno $0,3 \mu\text{M}$; t-PA (entre 25 y 200 U/ml); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. En simultáneo se repitió el ensayo con agregado de un estimulador de t-PA comercial (PDF, producto de degradación de fibrina y fibrinógeno).

Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Blanco t-PA = t-PA 200 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Preparación y caracterización de un producto estimulador de t-PA soluble

La fibrina cumple una importante función como modulador de la fibrinólisis. La activación de Plg mediada por t-PA en medio plasmático es un proceso ineficiente, mientras que en presencia de fibrina la reacción de activación está potenciada. De esta manera, la acción de Plm se encuentra fisiológicamente restringida al coágulo sanguíneo.

Para seleccionar un estimulador de t-PA soluble que pueda utilizarse en ensayos funcionales amidolíticos de componentes del sistema fibrinolítico, se prepararon monómeros de fibrina (MF) y productos de degradación de fibrina/fibrinógeno (PD)⁽¹²¹⁾.

Todos los productos obtenidos fueron caracterizados mediante la determinación de concentración proteica por el método de Lowry, patrón electroforético por SDS-PAGE y capacidad de estimulación de t-PA en un ensayo amidolítico de activación de Plg. Además, estos productos fueron evaluados en comparación con un producto estimulador de t-PA comercial (PDF comercial o Estim. com).

1) Preparación de monómeros de fibrina (MF)

Se incubó plasma normal diluido o fibrinógeno purificado con trombina en *buffer* Tris-HCl 50 mM - cloruro de sodio (NaCl) 0,15 M, durante 2 horas a 37 °C. Se recogieron los coágulos formados con una varilla de vidrio y se redisolviaron en 0,5 ml de ácido acético 0,02 M (pH 4,5). Las soluciones obtenidas (MFp y MFf) fueron guardadas a 4 °C.

MONÓMEROS DE FIBRINA	de Plasma (MFp)	de Fbg purificado(MFf)
Plasma (<i>pool</i> normal)	1 ml	-----
Fibrinógeno (Fbg; 3 g/l)	-----	1 ml
<i>Buffer</i> Tris-HCl 50 mM - NaCl 0,15 M	3 ml	3 ml
Trombina (10 U/ml)	30 µl	30 µl

2) Preparación de productos de degradación de fibrina/fibrinógeno (PD)

Para obtener productos de degradación de fibrina (PDFbn) se incubó fibrinógeno purificado con trombina en *buffer* Tris-HCl 50 mM durante 5 minutos a 37 °C. Luego se agregó plasmina y se mantuvo la incubación a 37 °C durante 6 horas hasta lisis total del coágulo. Para obtener productos de degradación de fibrinógeno (PDFbg) se repitió el esquema de incubación sin el agregado de trombina.

Las soluciones obtenidas (PDFbn y PDFbg) fueron guardadas a 4 °C. Además, se preparó una mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) mezclando partes

iguales de las soluciones PDFbn y PDFbg.

PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN	de Fbg purificado (PDFbg)	de Fibrina (PDFbn)
Fibrinógeno (Fbg, 3 g/l)	1 ml	1 ml
<i>Buffer</i> Tris-HCl 0,5 M	130 μ l	130 μ l
Trombina (100 U/ml)	-----	30 μ l
Agua (H ₂ O)	30 μ l	-----
Plasmina (1,88 μ M)	75 μ l	75 μ l

3) Caracterización de los productos obtenidos y comparación con un producto estimulador de t-PA comercial. Selección de un producto de trabajo

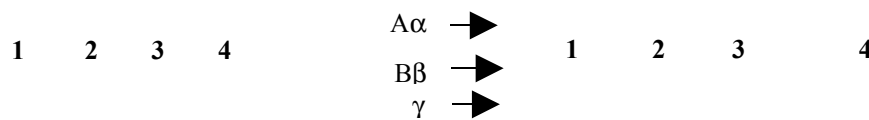
En la figura 12 se presenta el perfil electroforético obtenido para las distintas soluciones preparadas y para el estimulador comercial de t-PA.

Figura 12: Patrón electroforético en SDS-PAGE de los productos ensayados como estimuladores solubles de t-PA.

T gel concentrador 4 %, T gel separador 8,6 %.

MFp = monómeros de fibrina plasmática, MFf = monómeros de fibrina preparados a partir de fibrinógeno purificado, PDFbg = productos de degradación de fibrinógeno, PDFbn = productos de degradación de fibrina, PDF comercial = estimulador comercial de t-PA.

Se visualizan las cadenas A α (63 kDa), B β (56 kDa) y γ (57 kDa) del fibrinógeno debido a que la muestra fue previamente tratada con con 2-mercaptoetanol.



1 - MFp
 2 - MFf
 3 - Marcadores de Peso Molecular
 (212, 170, 116, 76, 70, 53, 45 y 29 kDa)
 4 - PDF comercial.

1 - Cadenas A α , B β y γ del fibrinógeno.
 2 - PDFbg
 3 - PDFbn
 4 - PDF comercial

Además, se determinó la concentración proteica y la capacidad de estimulación de t-PA de todos los productos preparados en un ensayo amidolítico de activación de Plg (Plg 0,3 μ M; t-PA humano 250 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4). Se agregó a la mezcla de reacción igual volumen de todos los productos ensayados y se comparó el efecto obtenido con el producto estimulador de t-PA comercial.

Para comparar el efecto de los productos ensayados se calcularon dos factores de potenciación: “ f_v ” asociado a la velocidad de reacción y “ $f_{t_{1/2}}$ ” asociado al tiempo correspondiente al 50 % de formación de producto (Ver detalles en esta misma sección de *Materiales y Métodos: ítem D*).

Monómeros de fibrina: en la figura 13 puede observarse que los MFp presentaron un efecto inhibitorio ($f_v < 1$ y $f_{t_{1/2}} > 1$), mientras que los MFf no modificaron la reacción estudiada (f_v y $f_{t_{1/2}} \approx 1$).

	f_v	$f_{t_{1/2}}$
Estim. Com (0,21 mg/ml)	1,92 $\pm 0,10$	0,63 $\pm 0,02$
MFp (1,25 mg/ml)	0,56 $\pm 0,02$	1,62 $\pm 0,03$
MFf (0,25 mg/ml)	1,14 $\pm 0,04$	0,91 $\pm 0,02$

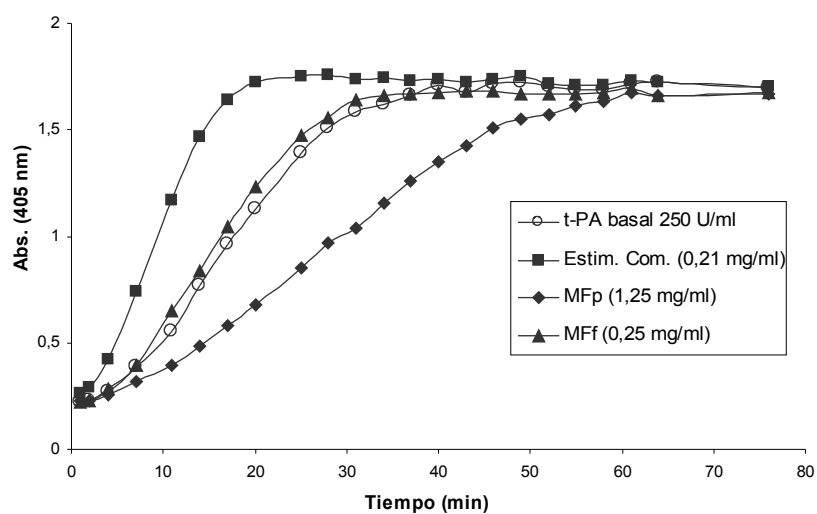


Figura 13: Evaluación del efecto de los monómeros de fibrina preparados como estimulador soluble de t-PA sobre la reacción de activación de plasminógeno. Comparación con un estimulador comercial.

MFP = monómeros de fibrina plasmática, MFF = monómeros de fibrina preparados a partir de fibrinógeno purificado, Estim. Com. = estimulador comercial.

Plasminógeno 0,3 μ M; t-PA 250 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado. En la tabla que acompaña la figura se presentan los factores de potenciación calculados para cada solución ensayada (media \pm error estándar; tres ensayos por duplicado).

Productos de degradación de fibrina/fibrinógeno: los tres PD evaluados presentaron un efecto estimulador de t-PA ($f_v > 1$ y $f_{t_{1/2}} < 1$), siendo similar la acción observada con PDFbn y PDF y levemente menor con PDFbg (figura 14).

	f_v	$f_{t_{1/2}}$
Estim. Com. (0,21 mg/ml)	1,92 \pm 0,12	0,63 \pm 0,02
PDFbg (0,19 mg/ml)	1,42 \pm 0,11	1,03 \pm 0,03
PDFbn (0,19 mg/ml)	1,42 \pm 0,10	0,88 \pm 0,03
PDF (0,18 mg/ml)	1,30 \pm 0,08	0,88 \pm 0,03
PDF (0,09 mg/ml)	1,53 \pm 0,13	0,75 \pm 0,03

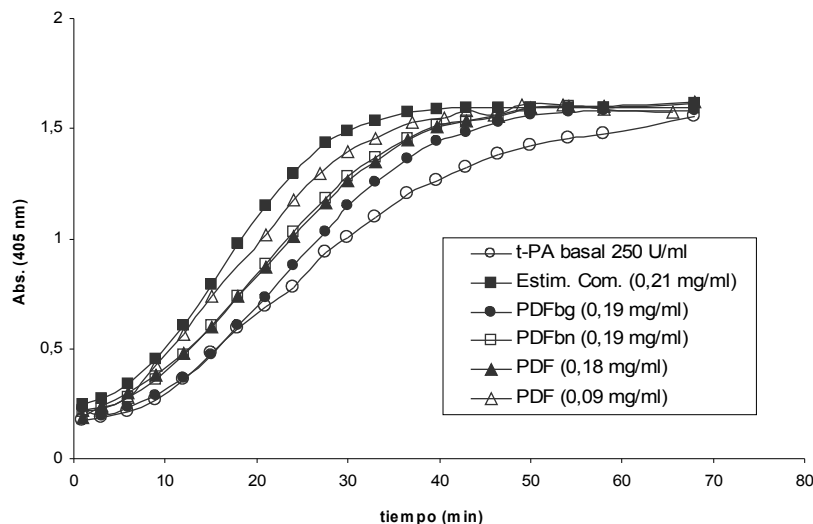


Figura 14: Evaluación del efecto de los productos de degradación de fibrina/fibrinógeno preparados como estimulador soluble de t-PA sobre la reacción de activación de plasminógeno. Comparación con un estimulador comercial.

PDFbg = productos de degradación de fibrinógeno, PDFbn = productos de degradación de fibrina. PDF = mezcla de PDFbg y PDFbn, Estim. Com. = estimulador comercial.

Plasminógeno 0,3 μ M; t-PA 250 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado. En la tabla que acompaña la figura se presentan los factores de potenciación calculados para cada solución ensayada (media \pm error estándar; tres ensayos por duplicado).

Entre los productos ensayados los únicos que presentaron efecto estimulador de t-PA fueron los productos de degradación de fibrina/fibrinógeno. El efecto observado fue similar al del producto comercial, por lo tanto se seleccionó la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) como estimulador soluble de t-PA para los siguientes ensayos de activación de Plg.

4) Evaluación del producto estimulador de t-PA de trabajo seleccionado

Una vez seleccionada la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) como estimulador soluble de t-PA para los siguientes ensayos amidolíticos de activación de Plg, sobre la solución de PDF obtenida se realizaron los siguientes controles:

✓ Se estudió el efecto de distintas concentraciones de PDF (0,03 y 0,36 mg/ml) para determinar la concentración de máximo efecto potenciador de la activación de Plg por t-PA (figura 15). Se seleccionó como concentración de trabajo 0,05 mg/ml, alcanzándose un efecto estimulador similar al producto comercial (Estimulador comercial: concentración óptima 0,21 mg/ml; $f_v = 2,10 \pm 0,16$ y $f_{t_{1/2}} = 0,50 \pm 0,05$).

✓ Se evaluó la actividad de plasmina residual en la solución de PDF por hidrólisis directa del sustrato S-2251. Para ello se realizó un blanco de reacción incubando PDF (0,06 mg/ml) y S-2251 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación.

No se observó actividad amidolítica sobre el sustrato S-2251, descartándose actividad residual de plasmina en la preparación de PDF a la concentración de trabajo seleccionada (figura 15). Además, la solución de PDF no modificó la acción de Plm pura en un ensayo amidolítico control ($f_{v_0} 1,07 \pm 0,04$).

✓ Se corroboró el efecto estimulador de los PDF (0,05 mg/ml) a distintas concentraciones de t-PA (figura 16).

✓ Se estudió la estabilidad del producto determinándose que el mismo puede ser conservado en heladera (4° C) hasta 30 días y en freezer (-20 °C) hasta 6 meses, sin modificarse sus propiedades como estimulador de t-PA.

	f_v	$f_{t_{1/2}}$
PDF 0,03 mg/ml	2,10 $\pm 0,14$	0,56 $\pm 0,02$
PDF 0,06 mg/ml	2,20 $\pm 0,13$	0,56 $\pm 0,03$
PDF 0,12 mg/ml	2,08 $\pm 0,08$	0,56 $\pm 0,04$
PDF 0,24 mg/ml	1,94 $\pm 0,15$	0,60 $\pm 0,02$
PDF 0,36 mg/ml	1,69 $\pm 0,12$	0,65 $\pm 0,04$

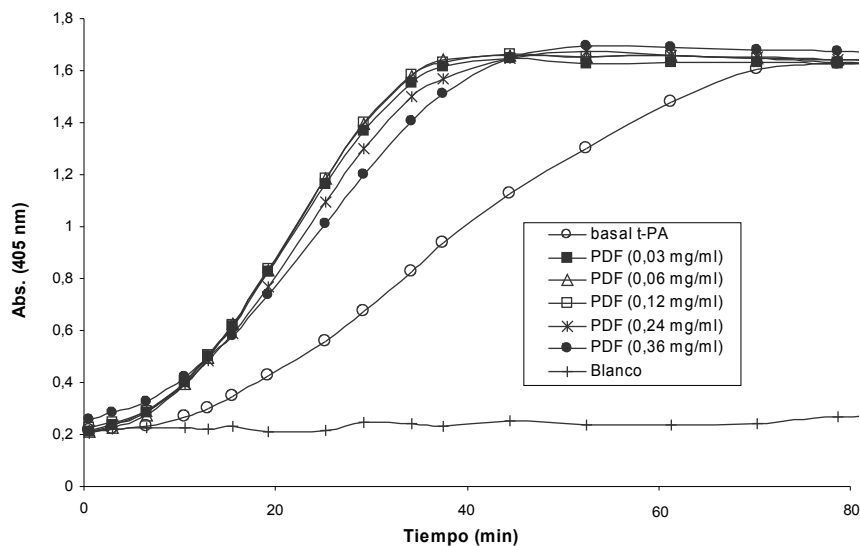


Figura 15: Evaluación del efecto de distintas concentraciones de PDF sobre la reacción de activación de plasminógeno mediada por t-PA.

Plasminógeno 0,3 μ M; t-PA 250 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

PDF = mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDFbg + PDFbn).

Blanco PDF = PDF 0,06 mg/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado. En la tabla que acompaña la figura se presentan los factores de potenciación calculados para cada solución ensayada (media \pm error estándar; tres ensayos por duplicado).

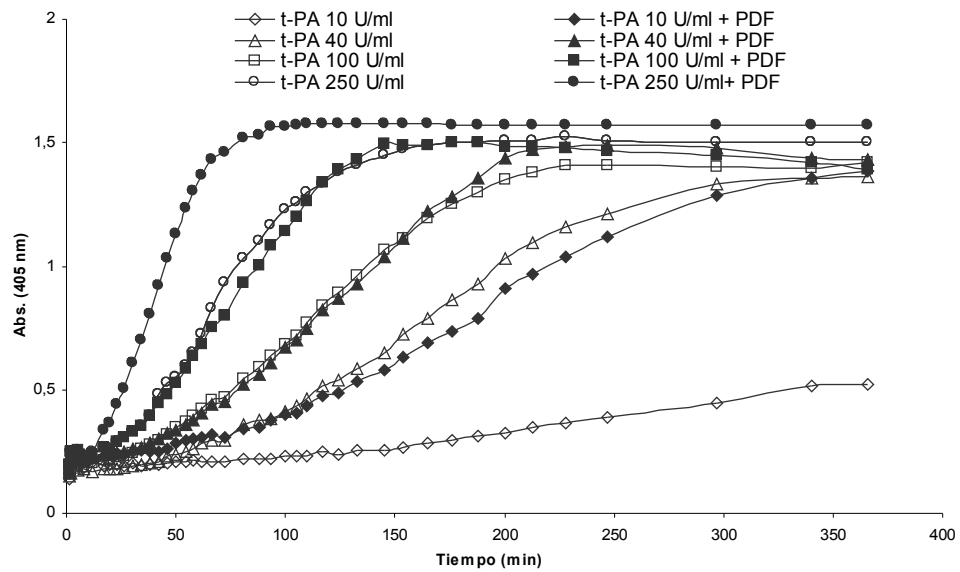


Figura 16: Evaluación del efecto de PDF sobre la reacción de activación de plasminógeno mediada por distintas concentraciones de t-PA.

Plasminógeno 0,3 μ M; t-PA (entre 10 y 250 U/ml); PDF 0,05 mg/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

PDF = mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDFbg + PDFbn).
Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno por t-PA

Para evaluar la activación de Plg en presencia de distintas concentraciones de DSA y DSB (entre 10 y 500 μ g/ml) se decidió utilizar una concentración de t-PA de 10 U/ml. La reacción de activación de Plg por t-PA se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: Plg (conc. final 0,3 μ M) + sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) + distintas concentraciones de DS (conc. final: 0 a 500 μ g/ml) + t-PA (conc. final 10 U/ml), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de t-PA.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 μ g/ml) sobre la reacción de activación de plasminógeno utilizando diferentes concentraciones de t-PA (5, 10 y 50 U/ml).

Todos los ensayos planteados fueron realizados en presencia y ausencia de la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) en concentración final 0,05 mg/ml.

A₃- ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR ESTREPTOQUINASA

En el año 1933 se reportó que el estreptococo hemolítico producía una proteína con capacidad de inducir la lisis de coágulos de plasma humano ⁽¹²²⁾. Posteriormente se determinó que esa proteína, denominada estreptoquinasa (SK), no era una enzima y que su acción dependía de la presencia de Plg. Actualmente, la SK se utiliza como activador exógeno del Plg en terapia trombolítica.

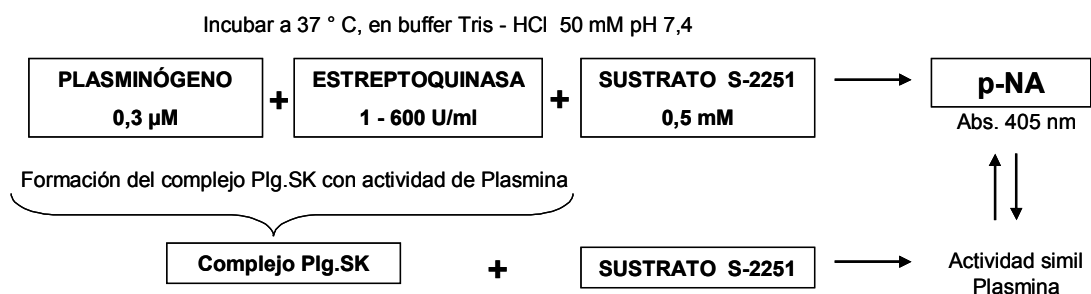
La actividad lítica de la SK requiere de la formación de un complejo estequiométrico 1:1 con el Plg (SK.Plg) y luego ese complejo sufre un cambio de conformación, dependiente del tiempo y la temperatura, exponiendo el sitio activo de la molécula de Plg (Plg*). El complejo SK.Plg*, presenta actividad sobre el sustrato cromogénico S-2251 de forma similar a la Plm libre.

Se utilizó estreptoquinasa Kabi AB, Estocolmo, Suiza.

Ensayo de activación de plasminógeno por SK

La reacción de activación de plasminógeno por SK se realizó en policubetas de poliestireno incubando Plg (0,3 µM) con distintas concentraciones de SK (entre 1 y 600 U/ml) y el sustrato cromogénico S-2251 (0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo.

Como blanco de reacción se incubó SK/S-2251 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación.



Esquema general del ensayo amidolítico de activación de plasminógeno por SK

Se estudió la reacción de activación de Plg en presencia de diferentes de concentraciones de SK (entre 1 y 600 U/ml). En la figura 17 puede observarse que a concentraciones de SK

mayores que 50 U/ml el proceso de activación fue instantáneo obteniéndose máximos de generación de actividad tipo Plm a tiempos menores de 20 minutos de incubación. Mientras que a concentraciones de SK menores que 50 U/ml existió una fase de latencia asociada al proceso de activación de Plg. Además, se confirmó que la SK no tiene acción directa sobre el sustrato S-2251 ya que el blanco realizado con la concentración máxima de SK utilizada en el ensayo (600 U/ml), no mostró cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia.

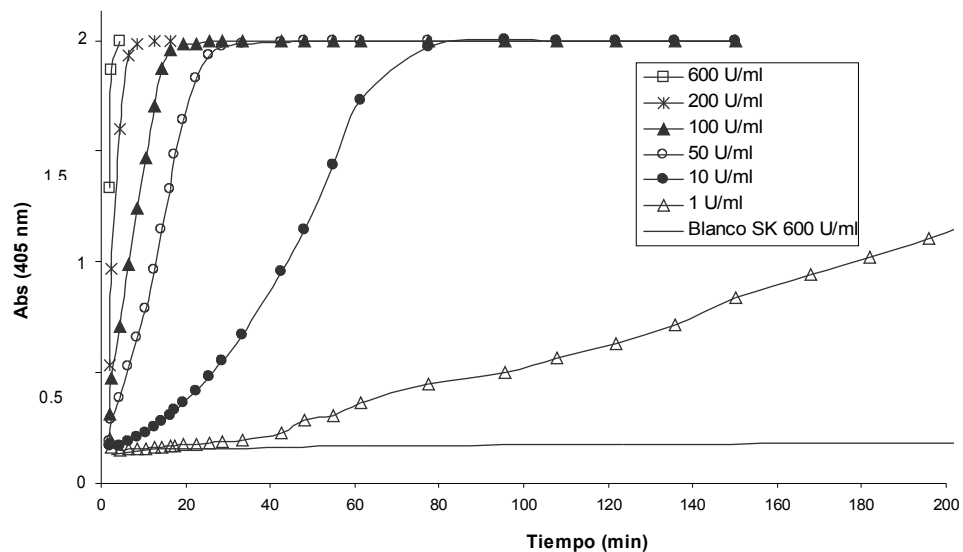


Figura 17: Ensayo de activación de plasminógeno utilizando distintas concentraciones de estreptoquinasa.

Plasminógeno 0,3 μ M; SK (entre 1 y 200 U/ml); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.
Blanco SK = SK 600 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno por SK

Para evaluar la activación de Plg en presencia de distintas concentraciones de DSA y DSB (4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 μ g/ml) se decidió utilizar una concentración de SK de 10 U/ml. La reacción de activación de Plg por SK se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: Plg (conc. final 0,3 μ M) + sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) + distintas concentraciones de DS (conc. final: 0 a 512 μ g/ml) + SK (conc. final 10 U/ml), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de SK.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) sobre la reacción de activación de Plg utilizando diferentes concentraciones de SK (5, 10 y 50 U/ml).

B.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD AMIDOLÍTICA DE PLASMINA

La plasmina obtenida por activación del Plg, es una serinoproteasa de dos cadenas unidas por puente disulfuro. La cadena pesada de la Plm contiene los 5 *kringles* y la cadena liviana contiene el sitio activo en el extremo C-terminal. La Plm cataliza la hidrólisis de los enlaces C-terminal a residuos arginina y lisina de la fibrina conduciendo a la lisis del coágulo. Esta enzima *in vitro*, tiene acción directa sobre el sustrato cromogénico S-2251.

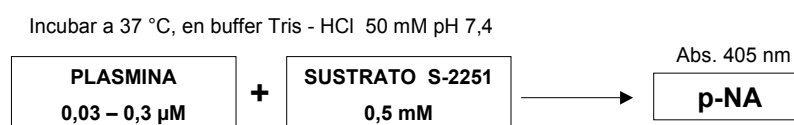
Se utilizó plasmina humana; Chromogenix, Milán, Italia.

Ensayo de actividad de plasmina

Para evaluar la actividad amidolítica de plasmina, se realizaron incubaciones de Plm (entre 0,03 y 0,3 μM) con el sustrato cromogénico S-2251 (0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad de Plm.

La concentración de Plm fue seleccionada como la cantidad de Plm formada (10, 25, 50, 75 y 100 %) durante el ensayo de activación de Plg descrito para los diferentes activadores utilizados.

NOTA: Todas las concentraciones indicadas son concentraciones finales en el medio de reacción.



Esquema general del ensayo amidolítico de actividad de plasmina

En la figura 18 se muestra la comparación de las curvas de actividad de Plm utilizando concentraciones entre 0,03 y 0,3 μM . Puede observarse que en este caso no hay fase de latencia ya que la reacción estudiada es directa sobre el sustrato cromogénico.

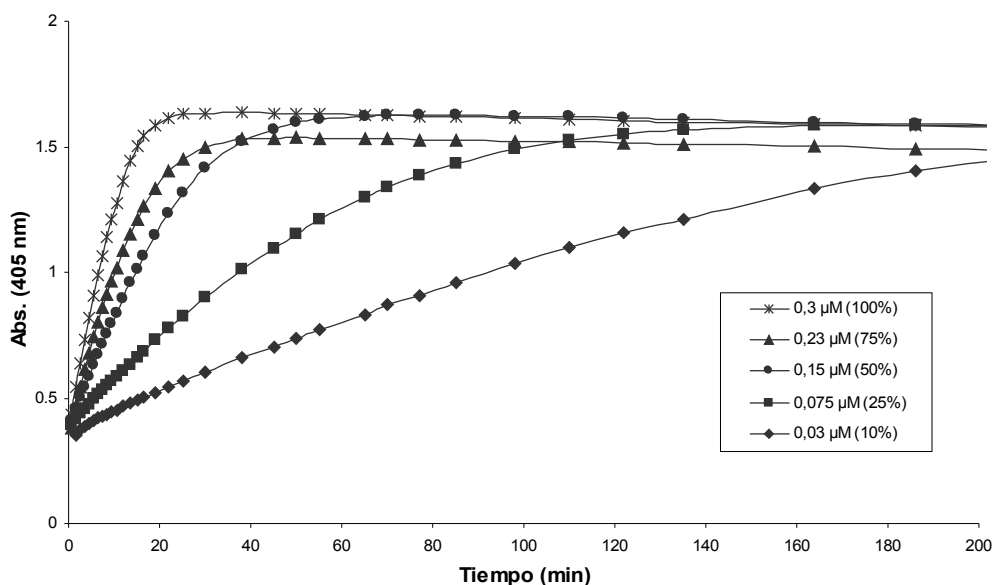


Figura 18: Ensayo de actividad de amidolítica de plasmina utilizando diferentes concentraciones.

Plasmina (0,03 a 0,3 μM); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

10, 25, 50, 75 y 100 % = cantidad de plasmina utilizada en este ensayo en referencia al % de conversión de plasminógeno durante el ensayo de activación optimizado.

Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de plasmina

Para estudiar el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 $\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad plasmínica se decidió utilizar una concentración de Plm de 0,15 μM , correspondiente al 50 % de conversión de Plg en el ensayo de activación. La reacción se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: Plm (conc. final 0,15 μM) + distintas concentraciones de DS (conc. final: 0 a 512 $\mu\text{g/ml}$) + sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de sustrato cromogénico.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad de diferentes concentraciones de Plm (0,075, 0,15 y 0,30 μM) correspondientes a 25, 50 y 100 % de conversión de Plg en el ensayo de activación.

C.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD AMIDOLÍTICA DE u-PA

El activador de plasminógeno de tipo urinario (u-PA) o uroquinasa (UK) tiene la capacidad de clivar el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del Plg para convertirlo en la enzima activa plasmina.

Este activador es sintetizado como proenzima de una sola cadena (scu-PA), con baja capacidad de activar plasminógeno, y es convertido a la forma activa de dos cadenas (tcu-PA) por clivaje del enlace Lys₁₅₈-Ile₁₅₉. A su vez existen dos formas de tcu-PA, una de alto peso molecular (HMW-UK) y otra de bajo peso molecular (LMW-UK).

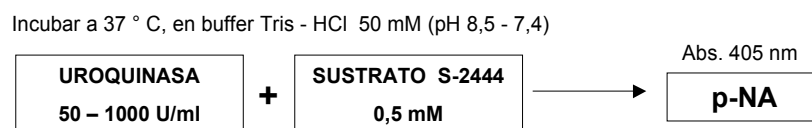
La uroquinasa *in vitro*, tiene acción directa sobre el sustrato cromogénico S-2444 y si bien HMW-UK es aproximadamente dos a tres veces más potente que LMW-UK en ensayos biológicos (lisis del coágulo), ambas formas son equivalentes respecto de su reactividad frente a este sustrato sintético ⁽¹¹⁹⁾.

Se utilizaron dos marcas comerciales de u-PA: UKIDAN del laboratorio Serono S.A. (Aubonne, Suiza) y UROQUINASA-UCB de Crinos Industria Farmacológica (Villa Guardia, Como, Italia).

Ensayo de actividad de u-PA

Para evaluar la actividad amidolítica de u-PA, se realizaron incubaciones de u-PA (entre 50 y 1.000 U/ml) con el sustrato cromogénico S-2444 (0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 y 7,4 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad de u-PA.

NOTA: Todas las concentraciones indicadas son concentraciones finales en el medio de reacción.



Esquema general del ensayo amidolítico de actividad de uroquinasa

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de u-PA frente al sustrato S-2444 ya que el pH recomendado para medir su actividad amidolítica (pH 8,5) era superior al pH utilizado en los ensayos amidolíticos de activación de Plg y actividad de Plm (pH 7,4).

En la figura 19 puede observarse que a concentraciones de u-PA superiores a 250 U/ml no hubo diferencias de actividad amidolítica a los distintos pH evaluados. Mientras que para concentraciones de u-PA entre 50 y 100 U/ml la actividad amidolítica de u-PA fue mayor

al pH indicado como óptimo, ya que la pendiente de las curvas a tiempo inicial (velocidad inicial) y el máximo de absorbancia alcanzado a pH 8,5 fueron mayores que a pH 7,4. Sin embargo, a los dos pH evaluados la actividad amidolítica de u-PA fue significativa en el rango de concentraciones utilizadas.

En función de estos resultados se decidió utilizar pH fisiológico (7,4) y una concentración de u-PA de 150 U/ml para estudiar la acción del dermatán sulfato sobre la actividad de u-PA.

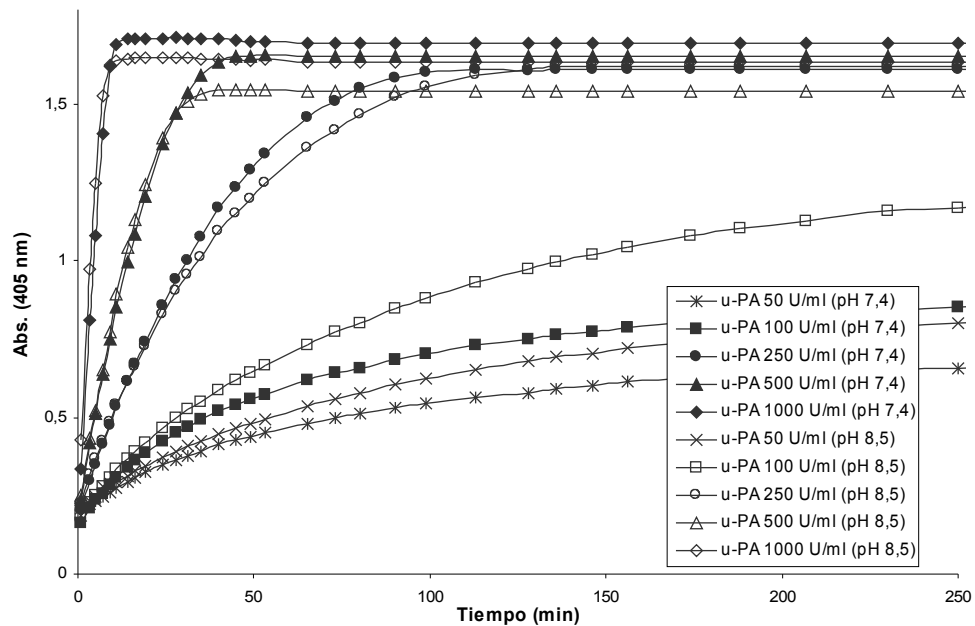


Figura 19: Ensayo de actividad amidolítica de u-PA en función del pH y la concentración de uroquinasa.

u-PA (entre 50 a 1.000 U/ml); S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y 8,5. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Por otro lado, si bien se utilizó u-PA extraído de orina humana y la forma activa de u-PA o tcu-PA es la forma en que este activador se encuentra en orina, se evaluó la posibilidad de que restos de pro-enzima o scu-PA puedan ser convertidos *in vitro* en la forma activa en presencia de Plm. Para ello se evaluó la actividad amidolítica de u-PA (150 U/ml) frente al sustrato S-2444 (0,5 mM) en presencia de Plm (2 nM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La reacción se realizó en policubetas de poliestireno y se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo. Como blanco de reacción se incubó Plm/S-2444 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación (blanco de Plm) y además, se realizó un blanco de reactivos sin u-PA ni agregado de Plm (blanco de reactivos).

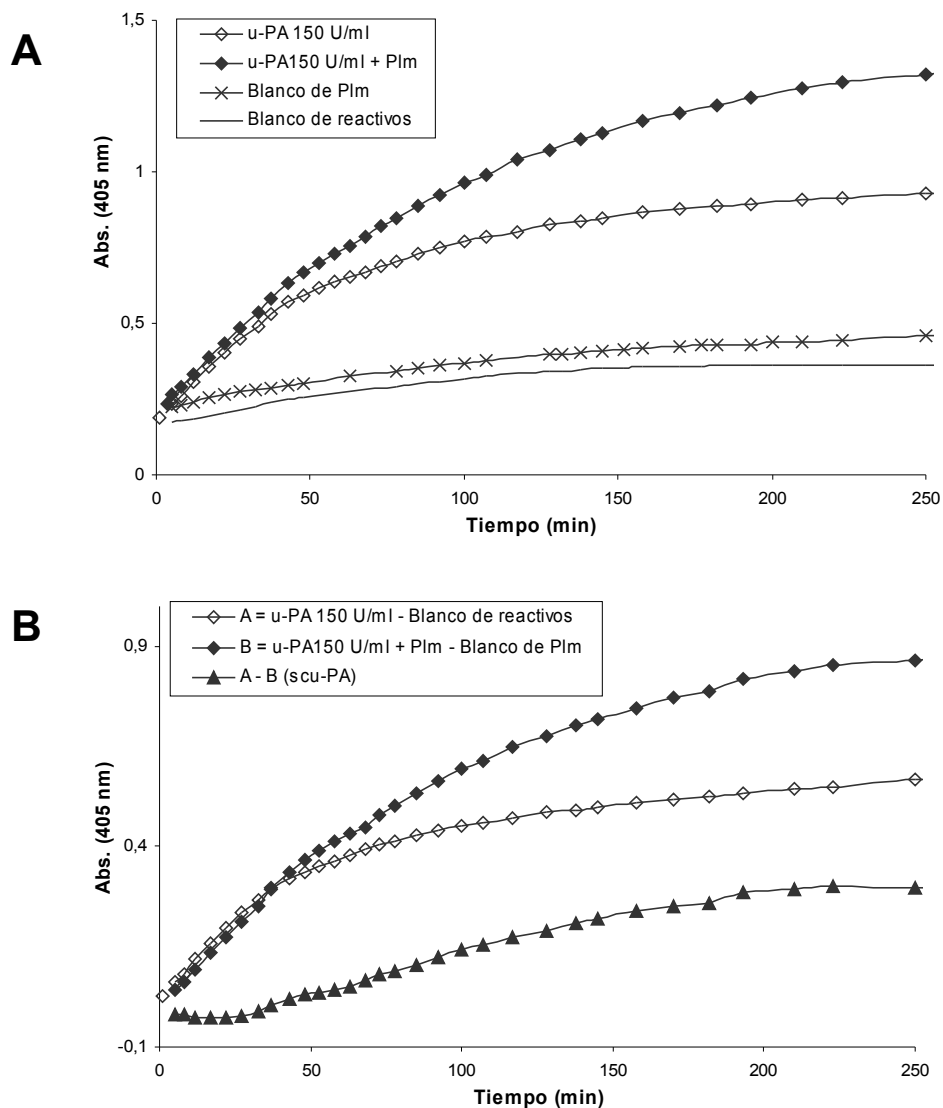


Figura 20: Ensayo de actividad amidolítica de u-PA en presencia de plasmina.

A) u-PA 150 U/ml (con o sin plasmina 2 nM); S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Blanco de Plm = Plasmina 2 nM; S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Blanco de reactivos = S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

B) Curvas con corrección de blancos

En la figura 20 A puede observarse que en presencia de Plm la actividad amidolítica de u-PA resultó mayor, si bien la Plm presentó mínima acción de hidrólisis del sustrato S-2444 (blanco de Plm). Por otro lado, se confirmó que la diferencia de actividad observada en presencia de Plm no resultó atribuible simplemente a la acción de Plm sobre el sustrato S-2444, ya que se mantuvo luego de corregir cada ensayo por su respectivo blanco (u-PA 150 U/ml – blanco de reactivos y u-PA 150 U/ml + Plm – blanco de Plm) (figura 20 B).

Además, la diferencia entre las curvas se presentó principalmente a partir de los 30 minutos de ensayo, aumentando la pendiente y el máximo de absorbancia alcanzado cuando el ensayo se realizó en presencia de Plm. Esta observación correspondería a una fase de latencia asociada a la conversión de scu-PA (pro-enzima) a la forma activa del activador (tcu-PA) por acción de Plm. La forma activa reaccionaría sobre el sustrato cromogénico explicando el cambio de la pendiente y el aumento en el máximo de absorbancia alcanzado.

Por lo tanto, no puede descartarse la conversión *in vitro* de scu-PA a tcu-PA en el ensayo realizado, aunque el aumento de actividad de u-PA en presencia de Plm correspondería aproximadamente a 10 - 15 %.

Efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de u-PA

En función de estos resultados se decidió utilizar una concentración de u-PA de 150 U/ml y trabajar a pH 7,4 para estudiar la acción de DSA y DSB 500 µg/ml sobre la actividad de u-PA. La reacción se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: u-PA (conc. final 150 U/ml) + DS (conc. final: 0 - 500 µg/ml) + sustrato cromogénico S-2444 (conc. final 0,5 mM), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado del sustrato cromogénico.

En una segunda etapa, para evaluar el efecto del DS sobre la reacción de conversión de scu-PA en tcu-PA, se estudió la acción del DSA y DSB sobre la actividad amidolítica de u-PA en presencia de Plm. Para ello se evaluó la actividad amidolítica de u-PA (150 U/ml) en condiciones basales y en presencia de DS (500 µg/ml) frente al sustrato S-2444 (0,5 mM) en presencia de Plm (2 nM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

D.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

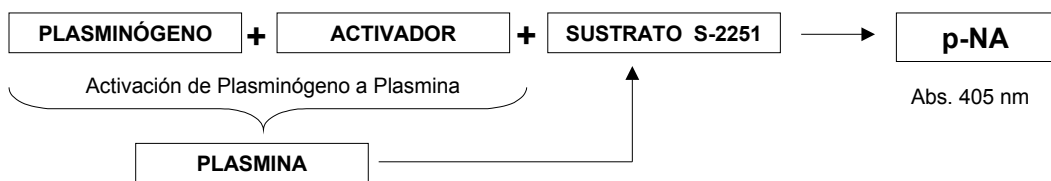
Método amidolítico para estudiar la reacción de activación de plasminógeno

El objetivo principal de esta tesis es estudiar la acción del dermatán sulfato en el sistema fibrinolítico. Para evaluar la etapa de activación de Plg se utilizaron como activadores: activador tisular de plasminógeno (t-PA), activador de plasminógeno de tipo urinario (u-PA) y estreptoquinasa (SK).

El aspecto general de las curvas de registro de datos durante las diferentes experiencias de

activación de plasminógeno resultó semejante, aunque existen diferencias entre los mecanismos de acción de los activadores utilizados. A continuación se detalla la metodología utilizada para el análisis de los resultados.

Recordemos que para evaluar la activación de plasminógeno se incubó Plg con distintas concentraciones de cada activador y el sustrato cromogénico S-2251 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. Teniendo en cuenta que la concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de la Plm formada, del gráfico de absorbancia *versus* tiempo se puede evaluar la cinética de activación de Plg y posteriormente el efecto del agregado de dermatán sulfato.

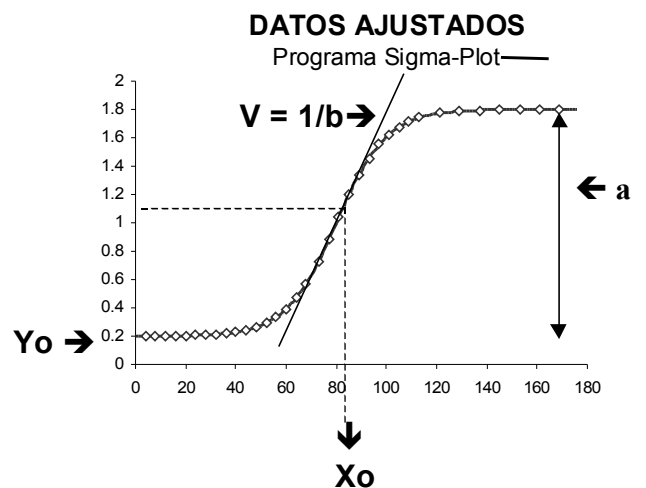
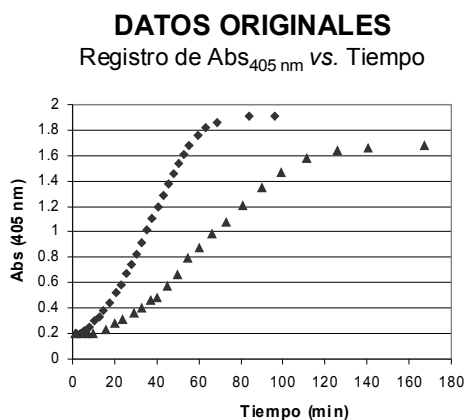


Esquema general de la reacción de activación de plasminógeno por método amidolítico

Nota 1: En el caso de la reacción de activación por **SK** se produce la formación de un complejo activo (Plg.SK) con actividad tipo plasmina.

Nota 2: La reacción de activación por **t-PA** también fue evaluada en presencia de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF).

Debido a que la reacción estudiada es en dos etapas, primero activación de Plg a Plm por acción del activador y segundo, hidrólisis del sustrato cromogénico por acción de la Plm formada, las curvas de registro de datos presentaron forma sigmoidea. Por lo tanto, para el análisis de los datos se ajustaron las curvas obtenidas con la ecuación sigmoidea utilizando el programa Sigma-Plot para *Windows* (versión 7.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.).



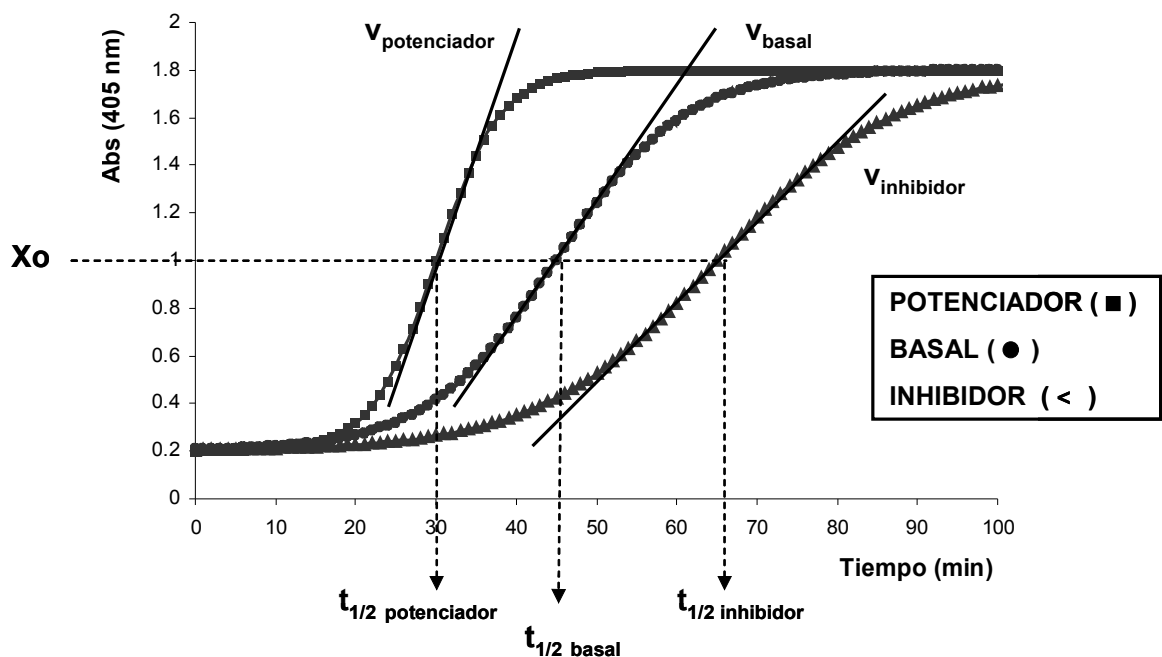
$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + e^{-(X - X_0)/b}}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} y_0 = \text{mínimo de Abs. (blanco)} \\ a = \text{Abs. máxima} - \text{Abs. mínima} \\ x_0 = \text{tiempo asociado al 50 \% de reacción} = t_{1/2} \\ 1/b = V = \text{estimador de la velocidad de reacción} \end{array} \right.$$

El parámetro “ y_0 ” representa al blanco de reactivos, mientras que el parámetro “ a ” representa la diferencia total de absorbancia entre el tiempo inicial y final de reacción y depende principalmente de la concentración de sustrato cromogénico utilizada. El parámetro “ $t_{1/2}$ ” representa el tiempo asociado al 50 % de formación de producto y el parámetro “ V ” representa la pendiente o velocidad de la reacción. Estos últimos dos parámetros caracterizan la forma general de las curvas de activación de plasminógeno y dependen de las condiciones de trabajo, la concentración de plasminógeno, activador y sustrato cromogénico, o sea representan la cinética de la reacción de activación.

Por lo tanto, si se mantienen constantes las condiciones de reacción como temperatura, características del *buffer* (pH y concentración), concentración de sustrato cromogénico, plasminógeno y activador; y manteniendo estas condiciones se agrega dermatán sulfato, se puede estudiar su efecto sobre la reacción de activación de plasminógeno.

Para ello se analizaron las modificaciones en las curvas de registro de absorbancia 405 nm *versus* tiempo obtenidas en presencia de DS respecto de las obtenidas en condiciones basales (ausencia de DS).



La forma de las curvas obtenidas en presencia de DS podrían responder a un patrón de potenciación o inhibición de la reacción de activación de plasminógeno, por lo tanto se analizaron los parámetros “ $t_{1/2}$ ” y “ V ” para interpretar estos posibles efectos.

Cuando el efecto observado es potenciación, $t_{1/2}$ en presencia de DS resulta menor que $t_{1/2}$ basal ($t_{1/2\ DS} < t_{1/2\ basal}$) y V en presencia de DS resulta mayor que V basal ($V_{DS} > V_{basal}$). Mientras que cuando el efecto observado es inhibición, $t_{1/2}$ en presencia de DS resulta mayor que $t_{1/2}$ basal ($t_{1/2\ DS} > t_{1/2\ basal}$) y V en presencia de DS resulta menor que V basal ($V_{DS} < V_{basal}$).

Se definió factor de potenciación (f) al cociente entre el parámetro en estudio en presencia de DS respecto del obtenido en condiciones basales. Por lo tanto el factor de potenciación $f_{t_{1/2}}$ corresponde al cociente entre $t_{1/2\ DS}$ y $t_{1/2\ basal}$ y factor de potenciación f_V corresponde al cociente entre V_{DS} y V_{basal} . Estos factores de potenciación se utilizaron para comparar los efectos del agregado de DS.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico Statistix (versión 2.1, Analytical Software, Tallahassee, Florida, EE.UU.) y se aplicó el *test* de *Wilcoxon* (*Wilcoxon Signed Rank Test*). La hipótesis nula (H_0) fue $t_{1/2\ basal} = t_{1/2\ DS}$ y $V_{basal} = V_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $t_{1/2\ basal} > t_{1/2\ DS}$ y $V_{basal} < V_{DS}$ y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

$$\begin{array}{ccc}
 \text{POTENCIACIÓN} & \left\{ \begin{array}{c} \text{ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO} \\ f_{t_{1/2}} = \frac{t_{1/2\ DS}}{t_{1/2\ basal}} \quad f_V = \frac{V_{DS}}{V_{basal}} \end{array} \right. & \text{INHIBICIÓN} \\
 f_{t_{1/2}} < 1 \text{ y } f_V > 1 & & f_{t_{1/2}} > 1 \text{ y } f_V < 1
 \end{array}$$

Método amidolítico para estudiar la actividad de plasmina

Durante el ensayo de activación de plasminógeno se registra la actividad amidolítica de la plasmina formada por acción de los activadores sobre el plasminógeno. Por lo tanto, si se observa un efecto potenciador, asociado al aumento de la hidrólisis del sustrato cromogénico S-2251, este efecto puede deberse al aumento de la reacción de activación de plasminógeno propiamente dicha y/o a un aumento de la actividad amidolítica de la plasmina formada.

Para evaluar si el DS tiene efecto sobre la etapa de activación de plasminógeno o sobre la actividad de la plasmina generada se estudió la acción del DS sobre plasmina purificada.

Recordemos que para evaluar la actividad amidolítica de plasmina, se realizaron incubaciones de plasmina con el sustrato cromogénico S-2251 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo.



Esquema general del ensayo amidolítico de actividad de plasmina

Como la liberación de p-NA es proporcional a la actividad de plasmina, a partir del gráfico de absorbancia *versus* tiempo se puede estudiar la cinética de la reacción y posteriormente el efecto del agregado de DS.

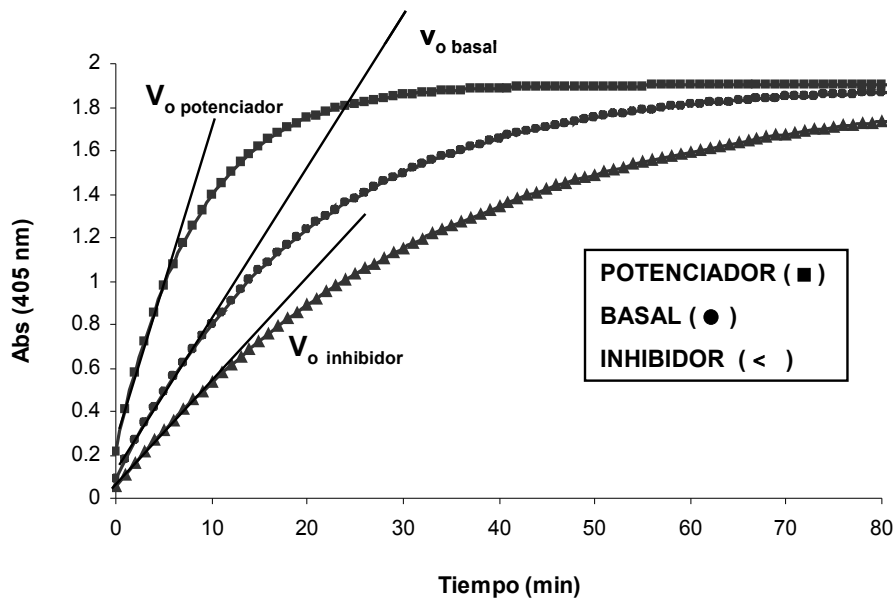
Las curvas de registro de datos presentaron forma exponencial, cuyo máximo depende principalmente de la concentración de sustrato cromogénico y cuya pendiente inicial depende principalmente de la concentración de plasmina y de las condiciones experimentales. Por lo tanto, si se mantienen constantes las condiciones de reacción como temperatura, características del *buffer* (pH y concentración), concentración de sustrato cromogénico y plasmina, y manteniendo estas condiciones se agrega dermatán sulfato, se puede estudiar su efecto sobre la actividad amidolítica de plasmina.

Para ello se analizaron las modificaciones en las curvas de registro de absorbancia $_{405\text{ nm}}$ *versus* tiempo obtenidas en presencia de DS respecto de las obtenidas en condiciones basales (ausencia de DS).

Para el análisis de las curvas obtenidas se utilizó el programa Sigma-Plot y se calculó la velocidad inicial (V_0) como la pendiente de la recta tangente a la curva exponencial a tiempo inicial.

La forma de las curvas obtenidas en presencia de DS podrían responder a un patrón de potenciación o inhibición de la actividad de plasmina, por lo tanto se analizó el parámetro " V_0 " para interpretar estos posibles efectos.

Cuando el efecto observado es potenciación V_0 en presencia de DS resulta mayor que V_0 basal ($V_{0\text{ DS}} > V_{0\text{ basal}}$), mientras que cuando el efecto observado es inhibición V_0 en presencia de DS resulta menor que V_0 basal ($V_{0\text{ DS}} < V_{0\text{ basal}}$).



Se definió el factor de potenciación asociado a V_o (f_{v_o}) como el cociente entre V_o en presencia de DS respecto de V_o obtenido en condiciones basales y éste parámetro se utilizó para comparar los efectos del agregado de DS.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statistix y se aplicó el *test* de *Wilcoxon*. La hipótesis nula (H_0) fue $V_{o \text{ basal}} = V_{o \text{ DS}}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $V_{o \text{ basal}} < V_{o \text{ DS}}$ y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

$$\begin{array}{ccc}
 \text{POTENCIACIÓN} & \left\{ \text{ENSAYO DE ACTIVIDAD AMIDOLÍTICA DE PLASMINA} \right. & \text{INHIBICIÓN} \\
 f_{v_o} > 1 & f_{v_o} = \frac{V_{o \text{ DS}}}{V_{o \text{ basal}}} & f_{v_o} < 1
 \end{array}$$

Método amidolítico para estudiar la actividad de u-PA

Como fue descripto anteriormente, durante el ensayo de activación de plasminógeno se registra la actividad amidolítica de la plasmina formada por acción de los activadores sobre el plasminógeno. Por lo tanto, un efecto potenciador de dermatán sulfato podría deberse a un aumento de la reacción de activación de plasminógeno propiamente dicha y/o a un aumento de la actividad amidolítica de la plasmina.

Previamente se describió la metodología para evaluar el efecto del DS sobre la actividad amidolítica de plasmina.

Para evaluar si el efecto del DS es sobre la actividad de los activadores de plasminógeno se

estudió la acción del DS sobre la actividad amidolítica de u-PA frente al sustrato cromogénico S-2444.

Recordemos que para evaluar la actividad amidolítica de u-PA, se realizaron incubaciones con el sustrato cromogénico S-2444 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo.



Esquema general del ensayo amidolítico de actividad de uroquinasa

Como la liberación de p-NA es proporcional a la actividad de u-PA, a partir del gráfico de absorbancia *versus* tiempo se puede estudiar la cinética de la reacción y posteriormente el efecto del agregado de DS.

Las curvas de registro de datos presentaron forma exponencial, cuyo máximo depende principalmente de la concentración de sustrato cromogénico y cuya pendiente inicial depende principalmente de la concentración de u-PA y de las condiciones experimentales. Por lo tanto, si se mantienen constantes las condiciones de reacción como temperatura, características del *buffer* (pH y concentración), concentración de sustrato cromogénico y de u-PA, y manteniendo estas condiciones se agrega dermatán sulfato, se puede estudiar su efecto sobre la actividad amidolítica del activador.

Para ello se analizaron las modificaciones en las curvas de registro de absorbancia $_{405\text{ nm}}$ *versus* tiempo obtenidas en presencia de DS respecto de las obtenidas en condiciones basales (ausencia de DS).

Para el análisis de las curvas obtenidas se utilizó el programa Sigma-Plot y se calculó la velocidad inicial (V_0) como la pendiente de la recta tangente a la curva exponencial a tiempo inicial. El análisis del parámetro “ V_0 ” se realizó del mismo modo que para los ensayos de actividad amidolítica de plasmina.

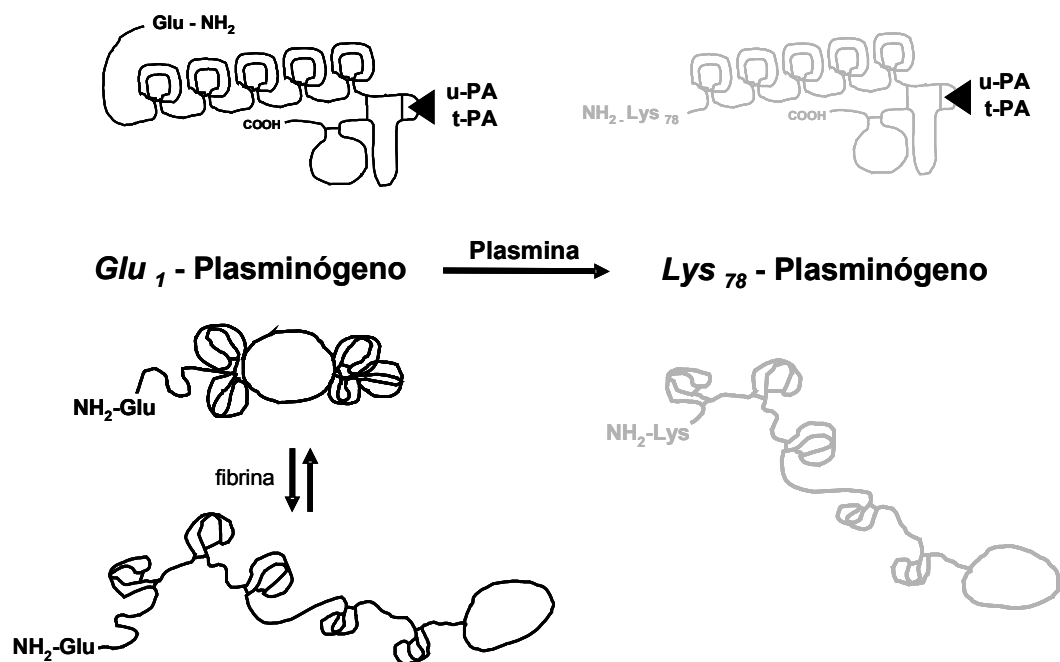
PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Lys-PLASMINÓGENO

Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plg

El plasminógeno nativo es una glicoproteína de simple cadena de 92 kDa que contiene un ácido glutámico en la región N-terminal (Plg o Glu-Plg). En condiciones fisiológicas el Glu-Plg presenta una configuración cerrada de tipo *prolate ellipsoid* debido a la interacción no covalente entre la porción N-terminal y los sitios LBS presentes en los *kringles*. Sin embargo, por interacción con fibrina adopta una conformación abierta y flexible que resulta más fácilmente activada por t-PA y u-PA ⁽¹⁸⁾.

Además, existen otras formas de Plg denominadas Lys-Plg, obtenidas por proteólisis plasmínica de los enlaces Arg₆₈-Met₆₉, Lys₇₇-Lys₇₈ o Lys₇₈-Val₇₉, que contienen como aminoácido terminal metionina, lisina o valina. Si bien en condiciones fisiológicas la conversión a Lys-Plg mediada por plasmina no se produce, ya que la plasmina libre es rápidamente inactivada por α_2 -antiplasmina ⁽¹⁹⁾, el Lys-Plg es de gran utilidad en el laboratorio de investigación ya que representa la configuración abierta del Glu-Plg debido a que no posee la porción N-terminal.

Tanto el Glu como el Lys-Plg pueden ser convertidos en plasmina por acción de los activadores del plasminógeno sobre el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂, formando Glu-Plm y Lys-Plm respectivamente.



Preparación de Lys-Plasminógeno

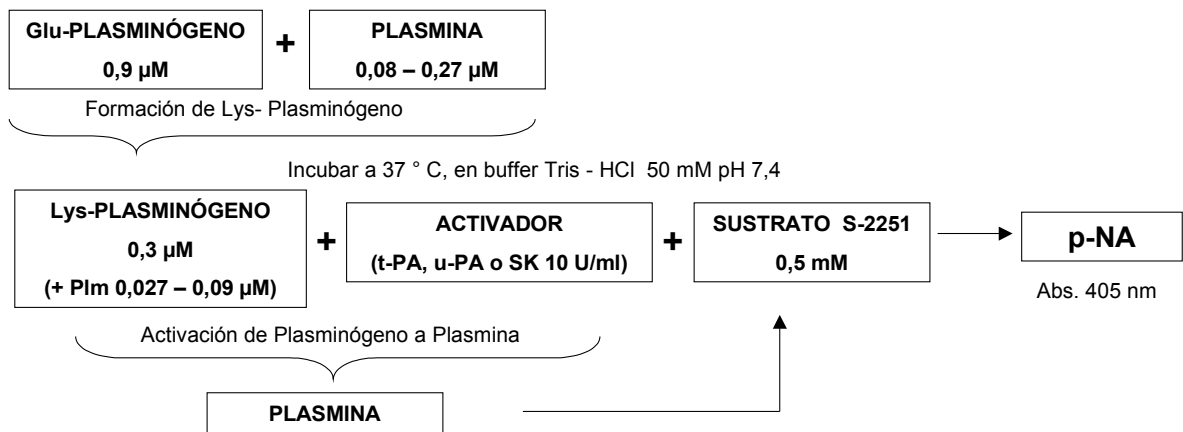
Lys-Plg fue obtenido por incubación de Glu-Plg ($0,9 \mu\text{M}$) con plasmina ($0,08$ a $0,27 \mu\text{M}$) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH $7,4$ durante 90 minutos a 37°C ⁽¹²³⁾.

Caracterización de Lys-Plasminógeno por método amidolítico

Para evaluar la formación de Lys-Plg se estudió la actividad del plasminógeno modificado por método amidolítico utilizando las condiciones experimentales descritas anteriormente para los ensayos de activación de plasminógeno por t-PA, u-PA y SK.

NOTA: Todas las concentraciones indicadas son concentraciones finales en el medio de reacción.

Incubar 90 minutos a 37°C , en *buffer* Tris - HCl 50 mM pH $7,4$



Esquema general de formación de Lys-plasminógeno y ensayo de actividad

Nota 1: En el caso de la reacción de activación de Lys-Plg por SK se produce la formación de un complejo activo (Lys-Plg.SK) con actividad tipo plasmina.

En la figura 21 puede observarse que *post* incubación de Glu-Plg con plasmina la fase de latencia asociada a la activación del Lys-Plg por u-PA formado resultó menor, mostrando experimentalmente que el Lys-Plg es más fácilmente convertido a plasmina que el Glu-Plg. Resultados similares fueron obtenidos utilizando t-PA y SK, confirmando que el Lys Plg es más fácilmente activado a plasmina que el Glu-Plg (datos no mostrados).

Se evaluaron distintas concentraciones de plasmina para convertir Glu-Plg en Lys-Plg. La cantidad de plasmina utilizada ($0,08$ a $0,27 \mu\text{M}$), expresada como % en moles de la cantidad de Glu-Plg inicial, resultó entre 3 y 10% . En todos los casos las curvas de activación de Lys-Plg resultaron similares, indicando que en las condiciones empleadas la formación de Lys-Plg fue completa (figura 21). Además, debe destacarse que la diferencia

en las características de las curvas de activación entre Glu y Lys-Plg no corresponde a la presencia de Plm en el ensayo de activación ya que la curva de activación asociada a Glu-Plg + Plm sin incubar no llegó a diferenciarse de la curva de Glu-Plg, indicando que el proceso de formación de Lys-Plg requiere de un tiempo de acción de la plasmina sobre el Glu-Plg.

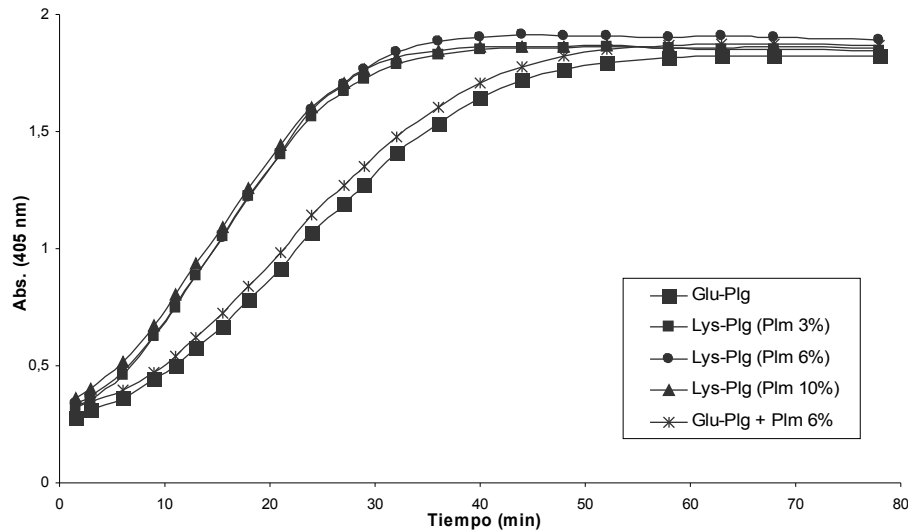


Figura 21: Activación de plasminógeno por método amidolítico. Comparación entre Glu-plasminógeno y Lys-plasminógeno.

Ensayo = Plasminógeno 0,3 μ M; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Glu-Plg = ensayo con Glu-Plg.

Lys-Plg (Plm X %) = ensayo con Lys-Plg formado por incubación de Glu-Plg con plasmina, en una cantidad expresada como % en moles de la cantidad de Glu-Plg inicial.

Glu-Plg + Plm = ensayo con Glu-Plg y Plm sin incubación previa.

Como control del procedimiento de preparación de Lys-Plg se realizaron diferentes blancos de la reacción de activación:

✓ Blancos de Plasmina

Teniendo en cuenta que la preparación de Lys-Plg contiene plasmina residual (Lys-Plg 0,9 μ M + Plm entre 0,08 y 0,27 μ M) y considerando la dilución realizada durante la realización del ensayo de activación (Lys-Plg 0,3 μ M + Plm 0,027 a 0,09 μ M), se evaluó la hidrólisis del sustrato S-2251 utilizando diluciones de Plm entre 0,027 y 0,09 μ M.

✓ Blanco de Glu-Plg

Glu-Plg 0,3 μ M; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

✓ Blanco de Glu-Plg + Plm sin incubar

Glu-Plg 0,3 μ M; Plm 0,054 μ M (6 %); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

✓ Blanco de Lys-Plg

Lys-Plg 0,3 μM (+ Plm 0,054 μM (6 %)); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

En la figura 22 puede observarse que el Glu-Plg no tiene acción sobre el sustrato cromogénico y que la actividad amidolítica asociada al blanco Glu-Plg + Plm 0,054 μM sin incubar, corresponde exclusivamente a la actividad de Plm sobre el sustrato cromogénico (blanco de Plm 0,054 μM).

Por otro lado, debe destacarse que la actividad amidolítica asociada al blanco Lys-Plg es mayor que la correspondiente al agregado de plasmina (blanco de Plm 0,054 μM). En función de este resultado que puede ser explicado teniendo en cuenta la actividad auto-catalítica de la plasmina, se evaluó la relación entre la cantidad de Plm agregada en el ensayo de formación de Lys-Plg y la cantidad de Plm detectable *post* incubación, por hidrólisis del sustrato S-2251. Se pudo determinar que en las condiciones experimentales utilizadas para la conversión de Glu-Plg en Lys-Plg, se obtuvo aproximadamente un 12 % (\pm 3%) de plasmina respecto de la masa original de Glu-Plg.

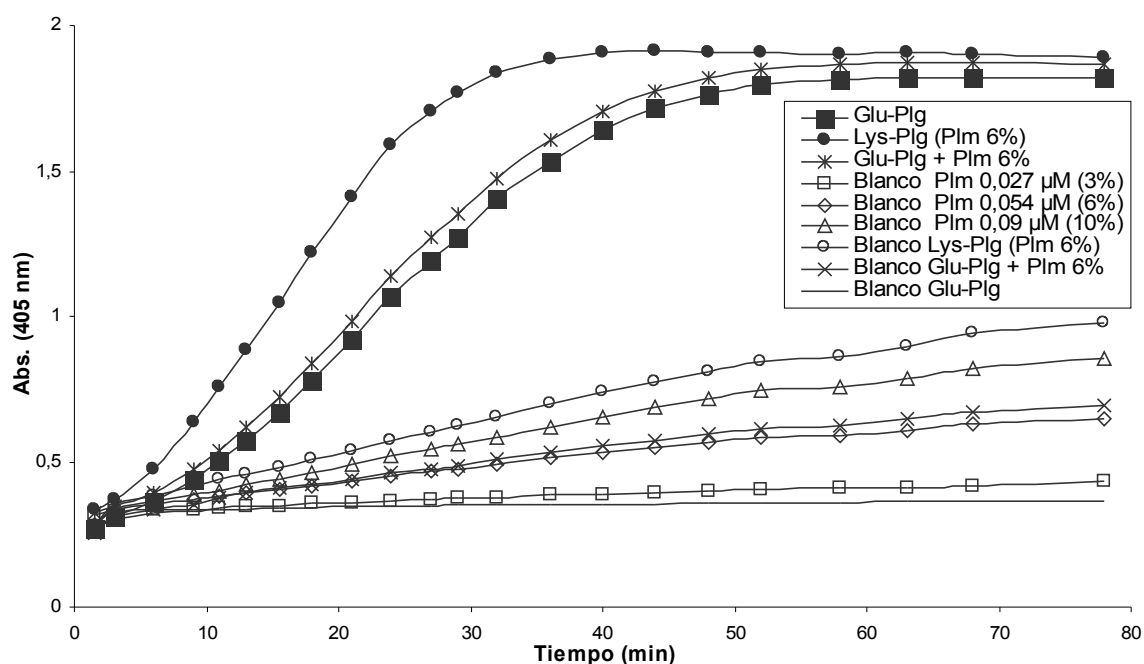


Figura 22: Activación de Lys-plasminógeno por método amidolítico. Blancos de reacción.

Glu-Plg = Glu-Plg 0,3 μM ; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl. **Lys-Plg** = Lys-Plg 0,3 μM ; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl. **Glu-Plg + Plm** = Glu-Plg 0,3 μM ; Plm 0,054 μM ; u-PA 10 U/ml; S-2251 50 mM; *buffer* Tris-HCl.

Blanco Glu-Plg = Glu-Plg 0,3 μM ; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl. **Blanco Glu-Plg + Plm** = Glu-Plg 0,3 μM ; Plm 0,054 μM ; S-2251 50 mM; *buffer* Tris-HCl. **Blanco Lys-Plg** = Lys-Plg 0,3 μM ; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl. **Blanco Plm** = Plm (entre 0,027 y 0,09 μM); S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl.

Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Plg = plasminógeno, Plm = plamina, *buffer* Tris-HCl = Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Caracterización de Lys-Plasminógeno por método electroforético

Se realizó electroforesis en SDS-PAGE para verificar el procedimiento de conversión de Glu-Plg en Lys-Plg.

En la figura 23 puede observarse que en las condiciones de incubación utilizadas todo el Glu-Plg (93 ± 5 kDa) fue convertido en Lys-Plg, obteniéndose una única banda de menor peso molecular correspondiente a 85 ± 6 kDa (peso molecular expresado como media \pm desvío estándar, tres corridas electroforéticas).

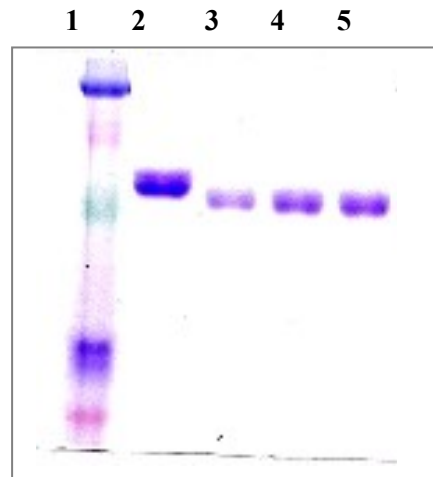
Figura 23: Preparación de Lys-plasminógeno. Caracterización por electroforesis SDS-PAGE.

T gel concentrador 4 %, T gel separador 8,6 %.

Perfiles electroforéticos de Lys-Plg obtenido por incubación con diferentes concentraciones de plasmina (Plm; entre 3 y 10 %) y de Glu-Plg.

Calles:

- 1 - Marcadores de peso molecular (207, 129, 85, 39,7 y 32 kDa)
- 2 - Glu-Plg
- 3 - Lys-Plg (Glu-Plg + Plm 3 %)
- 4 - Lys-Plg (Glu-Plg + Plm 6 %)
- 5 - Lys-Plg (Glu-Plg + Plm 10 %)



Se verificó por tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-ME), que tanto el Glu-Plg como el Lys-Plg presentaron un perfil simple cadena a diferencia de la Plm que es una proteína de dos cadenas (figura 24). En presencia de 2-ME se rompen enlaces disulfuro, que en el caso del Plg son intracatenarios, produciéndose la elongación de la cadena que en la corrida electroforética se manifestó como una única banda en zonas de mayor peso molecular debido a que la resistencia al desplazamiento de una molécula elongada es mayor que cuando la molécula es globular (sin 2-ME). En el caso de plasmina se rompen enlaces intra e intercatenarios de modo que se produce la ruptura de la molécula en las dos cadenas constitutivas y además, la elongación de las dos subunidades.

Puede notarse que en la corrida de Lys-Plg con 2-ME se observan bandas de menor peso molecular que corresponden a restos de plasmina. Este resultado coincide con los datos obtenidos en los ensayos de caracterización de Lys-Plg por método amidolítico.

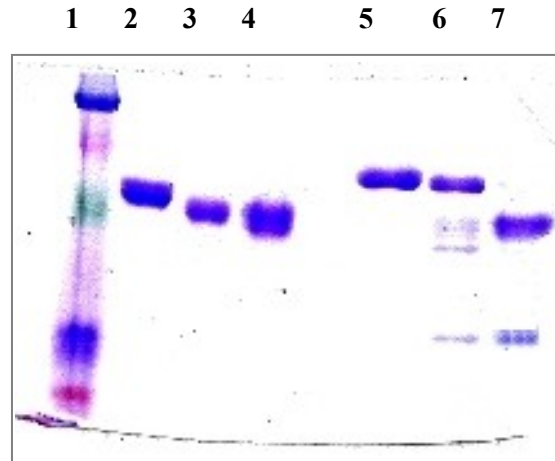
Figura 24: Caracterización de Lys-plasminógeno por electroforesis SDS-PAGE. Comparación con Glu-plasminógeno y plasmina.

T del gel concentrador 4 %, T del separador 8,6 %.

Perfiles electroforéticos de Lys-Plg (obtenido por incubación con plasmina 6 %), de Glu-Plg y de plasmina pura (Plm). Las calles 5, 6 y 7 corresponden a muestras tratadas con 2-mercaptoetanol (2-ME).

Calles:

- 1 - Marcadores de peso molecular (207, 129, 85, 39,7 y 32 kDa)
- 2 - Glu-Plg
- 3 - Lys-Plg (Glu-Plg + Plm 6 %)
- 4 - Plm
- 5 - Glu-Plg + 2-ME
- 6 - Lys-Plg (Glu-Plg + Plm 6 %) + 2-ME
- 7 - Plm + 2-ME



Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-plasminógeno

Se definieron como condiciones optimizadas para la obtención de Lys-Plg, la incubación de Glu-Plg 0,9 μM con plasmina 0,16 μM durante 90 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Para evaluar el efecto del DS sobre la reacción de activación, se utilizó el producto de reacción como fuente de Lys-Plg. Para el cálculo de la concentración de Lys-Plg se consideró, por convención, que la eficiencia de conversión de Glu-Plg en Lys-Plg fue 100 %.

Para evaluar la activación de Lys-Plg en presencia de 500 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y DSB, se decidió utilizar una concentración de t-PA, u-PA o SK de 10 U/ml.

La reacción de activación de Lys-Plg se realizó en policubetas de poliestireno agregando los diferentes reactivos en el siguiente orden: Lys-Plg (conc. final 0,3 μM) + sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) + DS (conc. final: 0 - 500 $\mu\text{g/ml}$) + activador (conc. final 10 U/ml), en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Se registró la absorbancia a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado del activador.

Como blanco de reacción se incubó Lys-Plg/S-2251 respetando las concentraciones finales del ensayo de activación. Además, se evaluó el efecto del agregado de DS sobre el blanco de reacción de Lys-Plg (blanco LysPlg/DS/S-2251).

El ensayo de activación con t-PA fue realizado en presencia y ausencia de la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) en concentración final 0,05 mg/ml.

Análisis de los resultados

Las curvas de registro de datos presentaron forma sigmoidea, al igual que para los ensayos de activación de Glu-Plg.

Para el análisis de los datos, los registros de absorbancia fueron corregidos por los blancos Lys-Plg/S-2251 (ensayo basal) o Lys-Plg/DS/S-2251 (ensayo en presencia de DS). Las curvas obtenidas se ajustaron con la ecuación sigmoidea, utilizando el programa Sigma-Plot.

Para estudiar el efecto del DS en la reacción de activación de Lys-Plg se analizaron las modificaciones en las curvas de registro de absorbancia $_{405\text{ nm}}$ *versus* tiempo obtenidas en presencia de DS respecto de las obtenidas en condiciones basales (ausencia de DS).

Como ya fue mencionado, los parámetros " $t_{1/2}$ " y " V " caracterizan la forma general de las curvas de activación de Plg y representan la cinética de la reacción de activación. Por lo tanto, para comparar los efectos del agregado de DS se utilizaron los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$. El análisis de los resultados se realizó del mismo modo que para los ensayos de activación de Glu-Plg.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE REDES DE FIBRINA

El objetivo general de esta tesis es evaluar la acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico. Teniendo en cuenta que la fibrina formada es el sustrato final de la reacción lítica y que sus características también determinan la velocidad global del proceso, se evaluaron los efectos del dermatán sulfato sobre la formación de fibrina. Para ello, se diseñaron experiencias *in vitro* para evaluar la acción del dermatán sulfato mediante estudios cinéticos de *fibrinoformación por recalcificación del plasma* y *por agregado de trombina*. Además, se evaluó la estructura de la fibrina formada en presencia de dermatán sulfato mediante estudios de *compactación* y *microscopía electrónica de barrido*.

FORMACIÓN DE REDES DE FIBRINA

• ENSAYO DE FIBRINOFORMACIÓN POR RECALCIFICACIÓN

La prueba conocida con el nombre de “Tiempo de coagulación del plasma recalcificado” se basa en reiniciar la cascada de activación del sistema de coagulación al agregar un exceso de iones calcio al plasma anticoagulado con citrato de sodio y medir el tiempo de formación de la fibrina ⁽¹²⁴⁾. Esta prueba depende principalmente de la capacidad de generación de trombina del plasma y por lo tanto, pueden observarse tiempos alargados en casos de déficit de factores o por la presencia de inhibidores de factores o de tipo anti-trombina.

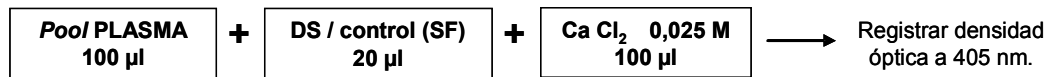
Se realizó una adaptación de esta técnica de coagulación que se describe a continuación y se utilizó para estudiar el efecto anticoagulante del dermatán sulfato.

Descripción de la técnica

La prueba se realizó en policubetas de poliestireno incubando 100 µl de plasma (*pool* de plasma) con 100 µl de solución de cloruro de calcio 0,025 M a 37 °C y registrando la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo hasta valor constante, utilizando un lector de ELISA, Reader 100, Organon Teknica, Miami, EE.UU.

Para evaluar el efecto anticoagulante del DSA y DSB se incorporó 20 µl de una solución de DS antes del agregado de cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la

concentración final de DSA resultara entre 1 y 50 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración final de DSB resultara entre 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica. Cada ensayo completo se realizó por quintuplicado.



Esquema general del ensayo de recalcificación del plasma

• ENSAYO DE FIBRINOFORMACIÓN POR AGREGADO DE TROMBINA

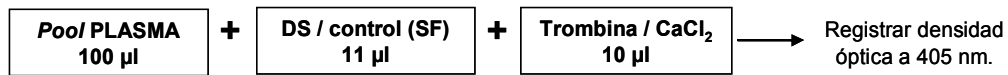
La prueba conocida con el nombre de “Tiempo de trombina” permite investigar la etapa de fibrinoformación, al medir el tiempo que tarda en coagular el plasma citratado en presencia de una concentración estandarizada de trombina ⁽¹²⁵⁾. Esta prueba depende principalmente de la calidad y cantidad de fibrinógeno presente en el plasma y de la presencia de anticoagulantes tipo anti-trombina, resultando muy sensible a la presencia de heparina.

En esta prueba se utiliza una concentración alta de trombina (10 U/ml) y se evalúa el tiempo de inicio de la formación del coágulo. Con el fin de evaluar por espectrometría el proceso completo de fibrinoformación, se realizó una adaptación de la técnica.

Descripción de la técnica

La prueba se realizó en policubetas de poliestireno incubando 100 μl de plasma (*pool* de plasma) con 10 μl de una solución de cloruro de calcio y trombina bovina a 37 °C y registrando la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo hasta valor constante, utilizando un lector de ELISA.

Para evaluar el efecto anticoagulante del DSA y DSB se incorporó 11 μl de una solución de DS antes del agregado de trombina y cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la concentración final de DSA resultara entre 4 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración final de DSB resultara entre 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica. Cada ensayo completo se realizó por quintuplicado.



Esquema general del ensayo de fibrinoformación por agregado de trombina

Optimización de las condiciones experimentales

Las concentraciones optimizadas de los distintos componentes de este ensayo resultaron:

- ✓ *Pool* de plasma sin diluir y diluido al 50 % con *buffer* PBS.
- ✓ Cloruro de calcio: concentración final 33 mM.
- ✓ Trombina bovina: concentración final 0,05 U/ml.

La concentración de trombina bovina fue optimizada de manera que la fibrinoformación pueda ser monitoreada por espectrofotometría y el tiempo de coagulación control resulte de aproximadamente 10 minutos (medido como el tiempo desde el agregado de trombina y cloruro de calcio hasta alcanzar la densidad óptica máxima). Para ello se realizaron ensayos de fibrinoformación a partir de *pool* de plasma sin diluir o diluido al 50 % en *buffer* PBS, por agregado de cloruro de calcio 33 mM y trombina en concentraciones finales entre 0,8 y 0,013 U/ml (figuras 25 y 26).

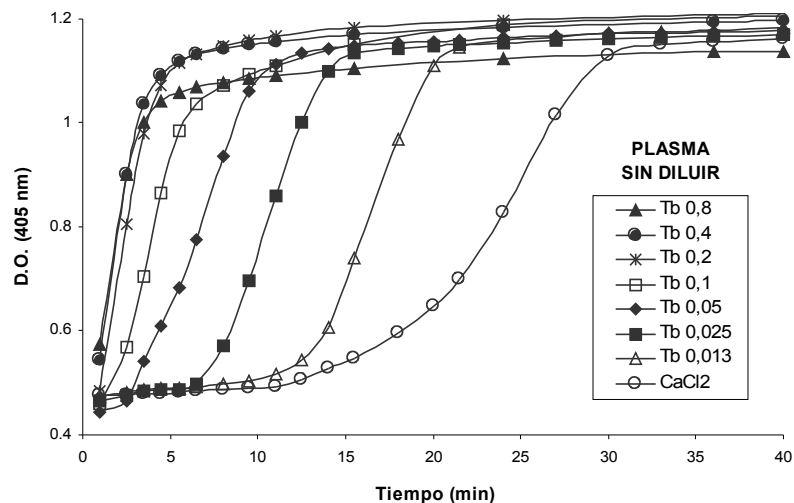


Figura 25: Fibrinoformación por agregado de trombina: optimización de la concentración de trombina.

Ensayo = plasma sin diluir + trombina (conc. final expresada en U/ml) + cloruro de calcio (conc. final 33 mM).

Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Tb = trombina, CaCl₂ = cloruro de calcio 33 mM.

Trabajando con *pool* de plasma sin diluir (figura 25) puede observarse que la fibrinoformación en presencia de concentraciones de trombina mayores a 0,2 U/ml fue

instantánea, mientras que para concentraciones menores existió una relación inversamente proporcional entre la concentración de trombina y el tiempo de coagulación.

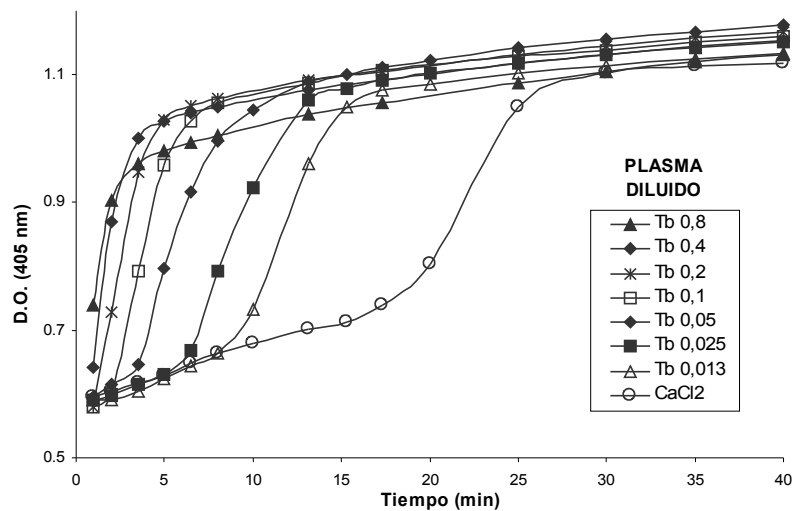


Figura 26: Fibrinoformación por agregado de trombina: optimización de la concentración de trombina.

Ensayo = plasma diluido al 50 % en *buffer* PBS + trombina (conc. final expresada en U/ml) + cloruro de calcio (conc. final: 33 mM).

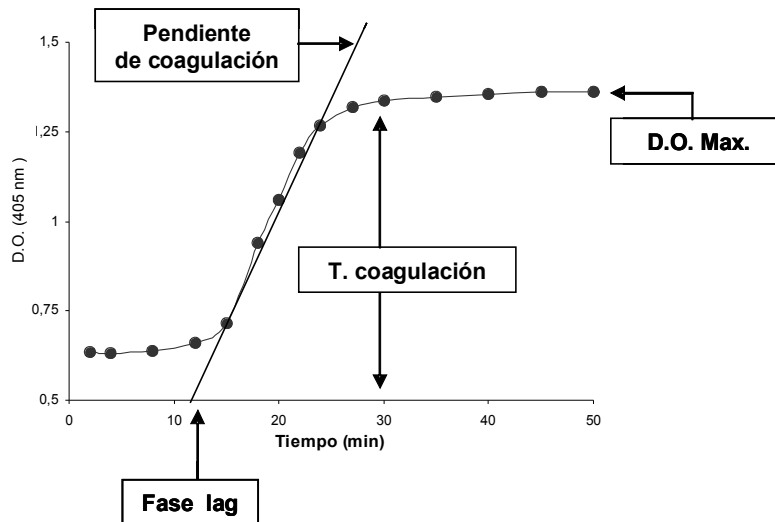
Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

Tb = trombina, CaCl₂ = cloruro de calcio 33 mM.

El patrón de coagulación para *pool* de plasma diluido (figura 26) resultó similar, aunque debe destacarse que las curvas presentaron una fase de latencia con una suave pendiente ascendente. Teniendo en cuenta que la dilución reduce principalmente la influencia de los inhibidores, probablemente este cambio de forma de las curvas pueda asociarse a la modificación del equilibrio trombina/anti-trombina debido a la dilución.

• ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para estudiar la etapa de fibrinoformación, ya sea por recalcificación del plasma o por agregado de trombina, las curvas obtenidas se caracterizaron mediante los siguientes parámetros: la fase de latencia de la curva sigmoidea correspondiente al tiempo de inicio de la coagulación (Fase lag), la pendiente asociada a la velocidad de fibrinoformación (Pendiente de coagulación), la densidad óptica máxima asociada a la densidad de la estructura formada (D.O. Max.) y el tiempo asociado a la formación completa de la red (T. coagulación).



El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios de cada parámetro en estudio de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney (Rank Sum Two-Sample Test)* para comparar los parámetros de las curvas obtenidas en presencia de DS respecto del control. La hipótesis nula (H_0) fue $Parámetro_{Control} = Parámetro_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $Parámetro_{Control} < Parámetro_{DS}$ para la comparación de “fase lag” y “tiempo de coagulación” y $Parámetro_{Control} > Parámetro_{DS}$ para la comparación de “velocidad de fibrinoformación” y “D.O. Máx.”.

ESTRUCTURA DE REDES DE FIBRINA

• ENSAYO DE COMPACTACIÓN DE REDES DE FIBRINA

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 compartimiento líquido limitado por esa estructura ^(126,127).

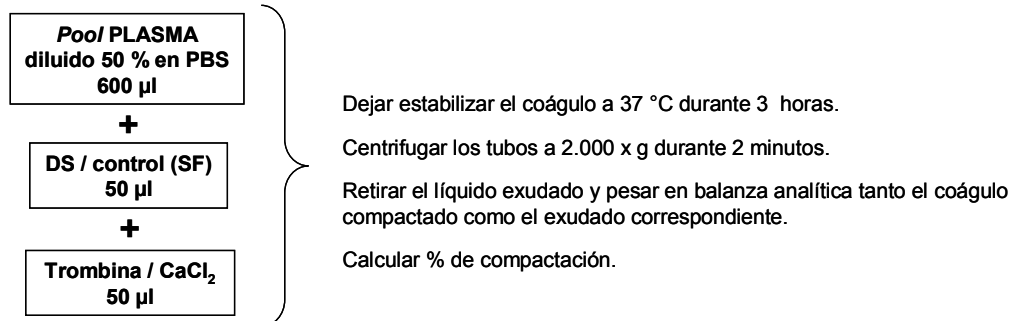
En general, estos ensayos se utilizan para estudiar disfibrinogenemias, evaluando la respuesta a la fuerza centrífuga de los geles de fibrina obtenidos a partir de plasma o fibrinógeno purificado.

Descripción de la técnica

Para realizar el ensayo de compactación se trabajó con *pool* de plasma diluido al 50 % en *buffer* PBS y se prepararon geles de fibrina por triplicado en microtubos plásticos, con 600 μ l de plasma diluido y 50 μ l de una solución de trombina bovina y cloruro de calcio, de modo que la concentración final resultara 0,05 U/ml y 33 mM respectivamente. La concentración de trombina bovina fue seleccionada teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de fibrinoformación presentados previamente.

Para evaluar el efecto anticoagulante del DSA y DSB se incorporó 50 μ l de una solución de DS antes del agregado de trombina bovina y cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la concentración final de DSA resultara entre 4 y 20 μ g/ml y la concentración final de DSB resultara entre 10 y 500 μ g/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica.

Se dejó gelificar a 37 °C durante 3 horas y luego los tubos se centrifugaron a 2.000 x g durante 2 minutos (Hermle Z 200 M/H, Hermle Labortechnik, Germany). Se determinó el peso de la solución exudada y el peso del coágulo compactado en balanza analítica (Mettler H10T, Kusunacht, Suiza). Cada ensayo completo se realizó por triplicado.



Esquema general del ensayo de compactación

Análisis de los resultados

Los resultados se expresan en porcentaje de compactación, calculado como la relación porcentual entre el peso del volumen exudado y el peso del total del gel de fibrina (peso del líquido exudado + peso del coágulo compactado).

El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios del porcentaje de compactación de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney* para comparar el porcentaje de compactación obtenido en presencia de DS respecto del control. La hipótesis nula (H_0) fue $\% \text{ Compactación}_{\text{Control}} = \% \text{ Compactación}_{\text{DS}}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $\% \text{ Compactación}_{\text{Control}} < \% \text{ Compactación}_{\text{DS}}$.

• IMAGEN DE LA RED DE FIBRINA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se determinó la estructura de redes de fibrina formadas en presencia de dermatán sulfato por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Descripción de la técnica

Para ello, se obtuvieron redes de fibrina a partir de *pool* de plasma por agregado de trombina bovina (conc. final 0,8 U/ml) y cloruro de calcio (conc. final 33 mM) sobre soportes de vidrio, en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular de modo que la concentración final resultara 4 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica. La concentración de trombina bovina fue seleccionada teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de fibrinoformación presentados previamente.

Las redes de fibrina formadas 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 y luego con tetróxido de osmio (1%). Luego fueron deshidratadas con soluciones de acetona en agua en concentraciones crecientes (50, 70, 85 y 100 % v/v). Todos los reactivos utilizados fueron provistos por Sigma, St. Louis, Montana, EE.UU. 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). Las observaciones se realizaron a 5 kV y se obtuvieron las fotografías correspondientes a 3.000 aumentos ⁽¹²⁸⁾.

Análisis de los resultados

Para realizar las mediciones sobre las fotografías de las observaciones microscópicas se utilizó el programa analizador de imágenes Imaje J 1.30v (National Institutes of Health, EE.UU.). Se evaluaron 30 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red midiendo: el número de fibras por campo, el porcentaje de red

(relación porcentual entre la superficie ocupadas por las fibras respecto al área total del campo) y el ancho y largo de las fibras.

Para el análisis estadístico de los resultados (Statistix) se aplicó el *test* de T (*Two-Sample T Test*) y el *test* de *Mann-Whitney*. La hipótesis nula (H₀) fue $Parámetro_{Control} = Parámetro_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H₁) fue $Parámetro_{Control} \neq Parámetro_{DS}$ y un *p* valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA LISABILIDAD DE REDES DE FIBRINA

El sistema fibrinolítico puede ser evaluado por métodos amidolíticos o coagulométricos. Los métodos amidolíticos se caracterizan por el uso de sustratos cromogénicos sintéticos, mientras que los métodos coagulométricos utilizan geles de fibrina como sustrato final de la reacción lítica. Los sustratos cromogénicos específicos presenta la ventaja de que permiten evaluar independientemente la actividad biológica de cada uno de los componentes involucrados en el sistema. Sin embargo, como se trata de sustratos sintéticos puede existir diferencia respecto de la actividad biológica frente al sustrato natural.

Los métodos coagulométricos en general estudian la actividad fibrinolítica global, evaluando el balance entre la acción de los activadores y los inhibidores fibrinolíticos en la función global de lisar un coágulo formado a partir de componentes plasmáticos. Además, como la fibrina formada es el sustrato final de la reacción lítica, sus características también determinan la velocidad global del proceso.

Teniendo en cuenta que el objetivo general de esta tesis es evaluar la acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico, se trabajó con sistemas purificados utilizando sustratos cromogénicos sintéticos para independizar los posibles efectos del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico de su conocido efecto anticoagulante. Sin embargo, aunque el uso de los métodos coagulométricos presenta una mayor dificultad para reconocer de manera clara un efecto puramente fibrinolítico respecto de una consecuencia experimental del efecto anticoagulante, se abordó el estudio también por esta metodología. Se diseñó un *ensayo de coagulación y fibrinólisis en dos etapas* para estudiar el efecto del dermatán sulfato sobre la formación y lisabilidad de redes de fibrina plasmática.

Además, se utilizaron dos pruebas bioquímicas clásicas para evaluar la actividad fibrinolítica, con el objetivo de estudiar el efecto del dermatán sulfato *ex vivo* sobre la lisabilidad de redes de fibrina formadas a partir de sangre entera y fracción de euglobulinas plasmática: *Tiempo de lisis del coágulo sangre entera diluida* y *Tiempo de lisis de euglobulinas* y se realizó una *adaptación de la prueba de lisis de euglobulinas* para estudiar por espectrofotometría la cinética de fibrinoformación y lisis euglobulinas.

A continuación se detallan los diferentes métodos utilizados, su optimización y el modo de análisis de los resultados.

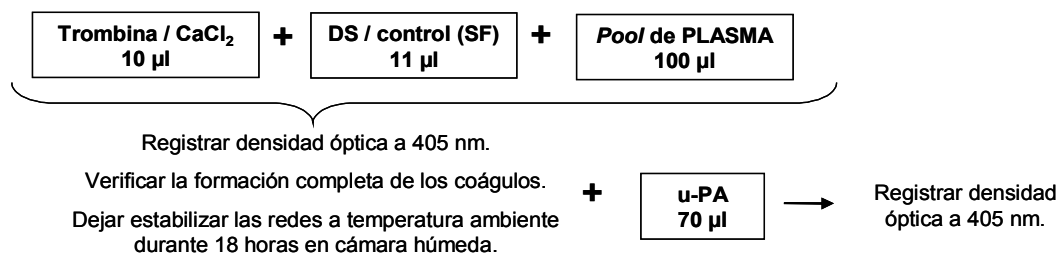
▪ ENSAYO DE COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS EN DOS ETAPAS

Para evaluar la lisabilidad de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato se diseñó un ensayo de fibrinoformación y lisis en dos etapas. El ensayo se desarrolló incubando *pool* de plasma con trombina y cloruro de calcio en presencia o ausencia de DS. Una vez finalizado el proceso de coagulación, se produjo la lisis del coágulo formado por agregado de un activador de plasminógeno.

En este ensayo *in vitro* la estructura de la red depende principalmente de la concentración plasmática de fibrinógeno y de la concentración de trombina y cloruro de calcio agregados. Por otro lado, el comportamiento del sistema lítico depende principalmente de la estructura de la red, la concentración plasmática de plasminógeno, la concentración del activador de plasminógeno agregado y la difusión de éste dentro de la red. En presencia de dermatán sulfato, la estructura de la red de fibrina formada y el comportamiento del sistema lítico también dependerán del efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de los componentes involucrados en cada proceso.

Descripción de la técnica y optimización de las condiciones experimentales

Para evaluar el efecto del DSA (conc. final: 4 a 100 $\mu\text{g/ml}$), trabajando en policubetas de poliestireno, se agregó 10 μl de solución de trombina y cloruro de calcio, 11 μl de una solución de DSA y se registró la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de 100 μl del *pool* de plasma. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DSA por solución fisiológica. Se verificó la formación completa de las redes por espectrofotometría y se dejaron estabilizar 18 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se agregó 70 μl de una solución de u-PA y se registró la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo. Durante el monitoreo de absorbancia las policubetas fueron conservadas en estufa a 37 °C. Cada ensayo completo se realizó por quintuplicado.



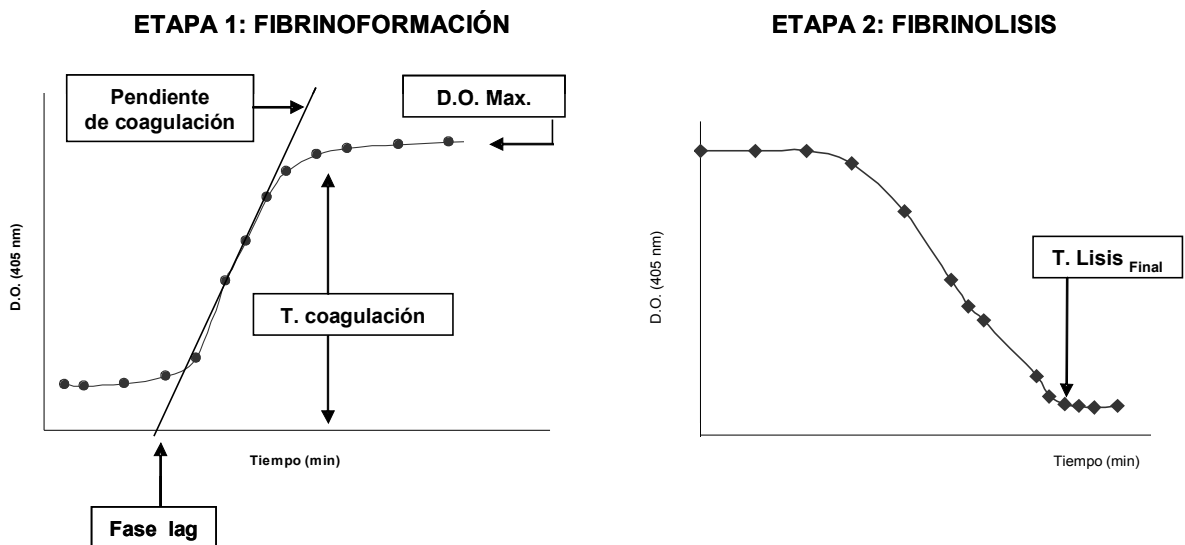
Esquema general del ensayo de coagulación y fibrinólisis en dos etapas

Las concentraciones optimizadas de los distintos componentes de este ensayo resultaron:

- ✓ *Pool* de plasma: aporta principalmente fibrinógeno y plasminógeno.
- ✓ Trombina bovina: concentración final 0,05 U/ml. La concentración de trombina bovina fue seleccionada teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de fibrinoformación presentados previamente.
- ✓ Cloruro de calcio: concentración final 33 mM.
- ✓ Activador del plasminógeno de tipo urinario (u-PA): concentración final 50 U/pocillo; diluido en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. La concentración de u-PA fue seleccionada de modo que la lisis total del coágulo control se completara en menos de 10 horas de ensayo.

Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos se separó la etapa de fibrinoformación de la etapa de lisis del coágulo.



Para estudiar la etapa de fibrinoformación, las curvas obtenidas se caracterizaron y evaluaron como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos: Formación de redes de fibrina*.

Para el análisis de la etapa de lisis, las curvas obtenidas a partir del agregado del activador de plasminógeno se caracterizaron mediante la determinación del parámetro tiempo lisis final correspondiente al tiempo en el que se estabilizó la densidad óptica del producto de lisis (T. lisis_{Final}).

El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios de cada parámetro en estudio de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney* para comparar los parámetros de las curvas obtenidas en presencia de DS respecto del control y un *p* valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para la comparación de los tiempos de lisis (T. Lisis) la hipótesis nula (H_0) fue $T. Lisis_{Control} = T. Lisis_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $T. Lisis_{Control} > T. Lisis_{DS}$.

• TIEMPO DE LISIS DEL COÁGULO DE SANGRE ENTERA DILUIDA

La prueba de lisis del coágulo de sangre entera diluida es una prueba global de evaluación del sistema fibrinolítico ⁽¹²⁹⁾. La técnica consiste en disolver la sangre en *buffer* fosfato y luego determinar el tiempo de lisis del coágulo formado por agregado de trombina. La dilución de la sangre entera, en la cual se mantiene la proporción normal de los componentes del sistema fibrinolítico, reduce la influencia de los inhibidores y facilita la acción de los activadores fibrinolíticos, acortando el tiempo de lisis de los coágulos formados por acción de trombina. El tiempo de lisis del coágulo sanguíneo es inversamente proporcional a la actividad fibrinolítica del plasma. En general es mayor a 18 horas, sin embargo puede resultar acortado cuando la actividad de antiplasmina está alterada, en presencia de estados hiperfibrinolíticos o cuando la capacidad de formación de fibrina esta afectada (hipofibrinogenemia u otras alteraciones de fibrinoformación).

Técnica original

Materiales:

1. Citrato de sodio 3,8 % p/v.
2. *Buffer* fosfato: fosfato monoácido de sodio 0,028 M; fosfato diácido de potasio 0,014 M; pH 7,4.
3. Trombina humana o bovina 50 U/ml.

Muestra: Se trabajó con sangre entera anticoagulada con citrato de sodio obtenida siguiendo las recomendaciones para las pruebas de fibrinolisis. La prueba fue realizada por duplicado y dentro de los 20 minutos de la obtención de la muestra.

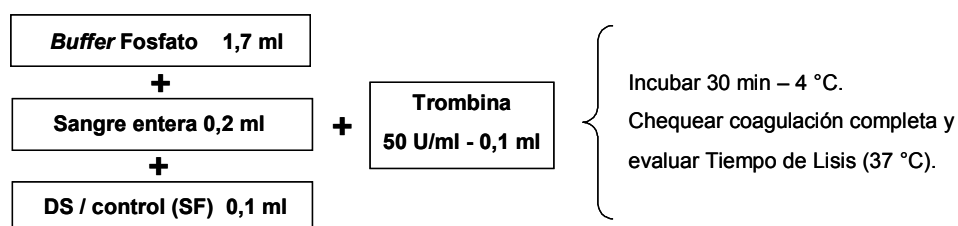
Desarrollo: En tubos de vidrio (tipo *Kahn*) se agregó 1,7 ml de *buffer* fosfato, 0,1 ml de la solución de trombina y 0,2 ml de sangre entera. Se mezcló inmediatamente por inversión y se dejó en heladera (4 °C) durante 30 minutos. Luego de verificar que la coagulación fuese completa en todos los tubos, se llevaron a un baño termostatzado a 37 °C, consignándose ese tiempo como tiempo cero. Periódicamente se investigó la lisis del coágulo formado. El tiempo asociado a la lisis completa del coágulo se asignó como tiempo de lisis de sangre entera diluida (LSE).

Efecto del dermatán sulfato *ex vivo* sobre el tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida

Se obtuvo sangre venosa de cinco individuos voluntarios sanos y se procedió con cada muestra según se describe a continuación:

Para evaluar el efecto del DSA y DSB se incorporó una solución de DS a la sangre entera diluida antes del agregado de trombina para formar el coágulo, de modo que la concentración final de DS resultara entre 0,2 y 50 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica.

Se determinó, por duplicado, el tiempo de lisis de sangre entera para el control (LSE_{control}) y cada una de las concentraciones de DS ensayadas (LSE_{DS}).



Esquema general del ensayo de lisis del coágulo de sangre entera diluida

Cada ensayo completo fue realizado en cinco oportunidades, utilizando sangre de un individuo sano cada vez. Los resultados finales se presentan como el promedio de las diferencias entre los tiempos obtenidos con cada control y los obtenidos en presencia de las diferentes concentraciones de DS ensayadas (LSE_{control} - LSE_{DS} ; n = 5).

Para el análisis estadístico de los resultados (Statistix) se aplicó el *test* de *Wilcoxon*. Para comparar el tiempo de lisis obtenido en presencia de DS respecto del control la hipótesis nula (H_0) fue $LSE_{Control} = LSE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $LSE_{Control} > LSE_{DS}$ y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo

• TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS

La prueba de lisis de euglobulinas es una prueba global de evaluación del sistema fibrinolítico ⁽¹³⁰⁾. La técnica consiste en precipitar en medio ácido la fracción de euglobulinas del plasma que contiene principalmente plasminógeno, fibrinógeno y los activadores del plasminógeno y separarla de los inhibidores del sistema fibrinolítico (PAI-1 y α_2 -antiplasmina) que quedan en solución. Luego el precipitado de euglobulinas se redisuelve en medio alcalino y se determina el tiempo de lisis del coágulo formado por agregado de cloruro de calcio o trombina.

El tiempo de lisis del coágulo formado a partir de la fracción de euglobulinas es inversamente proporcional a la actividad fibrinolítica del plasma. En general es entre 1 y 2 horas, sin embargo puede resultar acortado en estados hiperfibrinolíticos (aumento de activadores), por presencia de plasmina u otras enzimas proteolíticas o cuando la capacidad de formación de fibrina esta afectada (hipofibrinógeno u otras alteraciones de fibrinoformación) o alargado en presencia de estados hipofibrinolíticos o disfibrinogenemias protrombóticas.

Técnica original

Materiales:

1. Citrato de sodio 3,8 % p/v.
2. Ácido acético 1 % v/v.
3. Cloruro de calcio 0,025 M.
4. *Buffer* borato: cloruro de sodio 0,15 M; borato de sodio 2,6 μ M; pH 9.

Muestra: Se trabajó con plasma en citrato de sodio obtenido siguiendo las recomendaciones para las pruebas de fibrinolisis. La prueba fue realizada por duplicado y dentro de los 20 minutos de la obtención de la muestra.

Desarrollo: En tubos cónicos de vidrio se agregó 9 ml de agua destilada, 0,5 ml de plasma y 0,1 ml de ácido acético, se mezcló por inversión y se dejó en heladera (4 °C) durante 30 minutos. Luego se centrifugaron los tubos a 3.000 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejaron los tubos invertidos sobre papel de filtro durante 2 minutos y luego el precipitado se disolvió en 0,5 ml de *buffer* borato a 37 °C ayudándose con una varilla de vidrio. Se agregó 0,1 ml de cloruro de calcio a cada tubo y luego de esperar la coagulación completa se puso en marcha un cronómetro. A los 5 minutos, y a intervalos de 10 minutos se investigó la lisis del coágulo formado. El tiempo asociado a la lisis completa del coágulo se asignó como tiempo de lisis de euglobulinas (LE).

Efecto del dermatán sulfato *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas

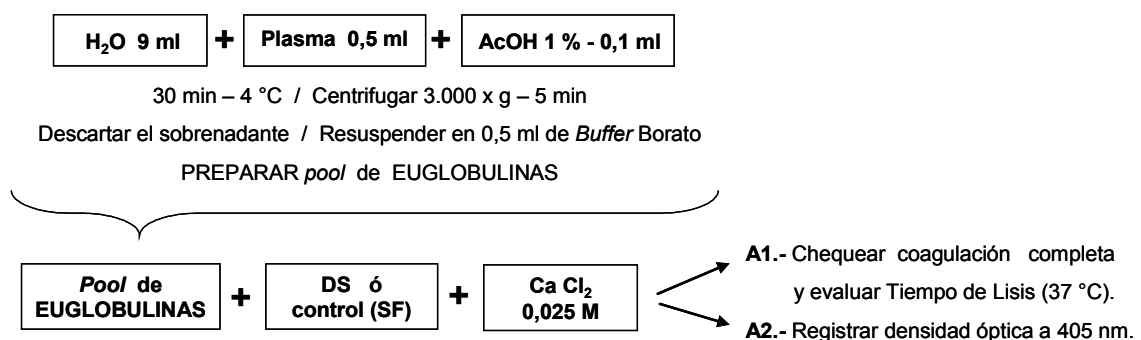
Se evaluó el efecto del DSA y DSB en dos etapas diferentes del procedimiento original: agregando DS en la solución de euglobulinas redisuelta (**A: lisis de euglobulinas estándar**) o agregando DS en el plasma previamente a la precipitación de euglobulinas (**B: lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de DS**).

A.- Efecto del dermatán sulfato sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar

Se obtuvo sangre venosa de cinco individuos voluntarios sanos, se separó el plasma y se obtuvo el precipitado de euglobulinas siguiendo las indicaciones descriptas en la técnica original. A partir de los precipitados obtenidos se preparó un *pool* de euglobulinas y se procedió según se describe a continuación:

A₁.- Evaluación del tiempo de lisis final por observación directa (técnica original)

A₂.- Evaluación del proceso de coagulación y lisis de euglobulinas por espectrofotometría (técnica adaptada)



Esquema general del ensayo de lisis de euglobulinas

A: Efecto del dermatán sulfato sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar

A₁- Evaluación del tiempo de lisis final por observación directa (técnica original)

Para evaluar el efecto del DSA y DSB se incorporó 40 µl de una solución de DS a 500 µl de la solución *pool* de euglobulinas antes del agregado de 100 µl de cloruro de calcio 0,025 M para formar el coágulo, de modo que la concentración final de DS resultara 10 y 100 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DS por solución fisiológica.

Se determinó, por quintuplicado, el tiempo de lisis de euglobulinas para el control (LE_{control}) y cada una de las concentraciones de DS ensayadas (LE_{DS}).

El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios del Tiempo de lisis de euglobulinas de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney* para el tiempo de lisis obtenido en presencia de DS respecto del control. La hipótesis nula (H₀) fue $LE_{Control} = LE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H₁) fue $LE_{Control} > LE_{DS}$ y un *p* valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

A₂- Evaluación del proceso de coagulación y lisis de euglobulinas por espectrofotometría (técnica adaptada)

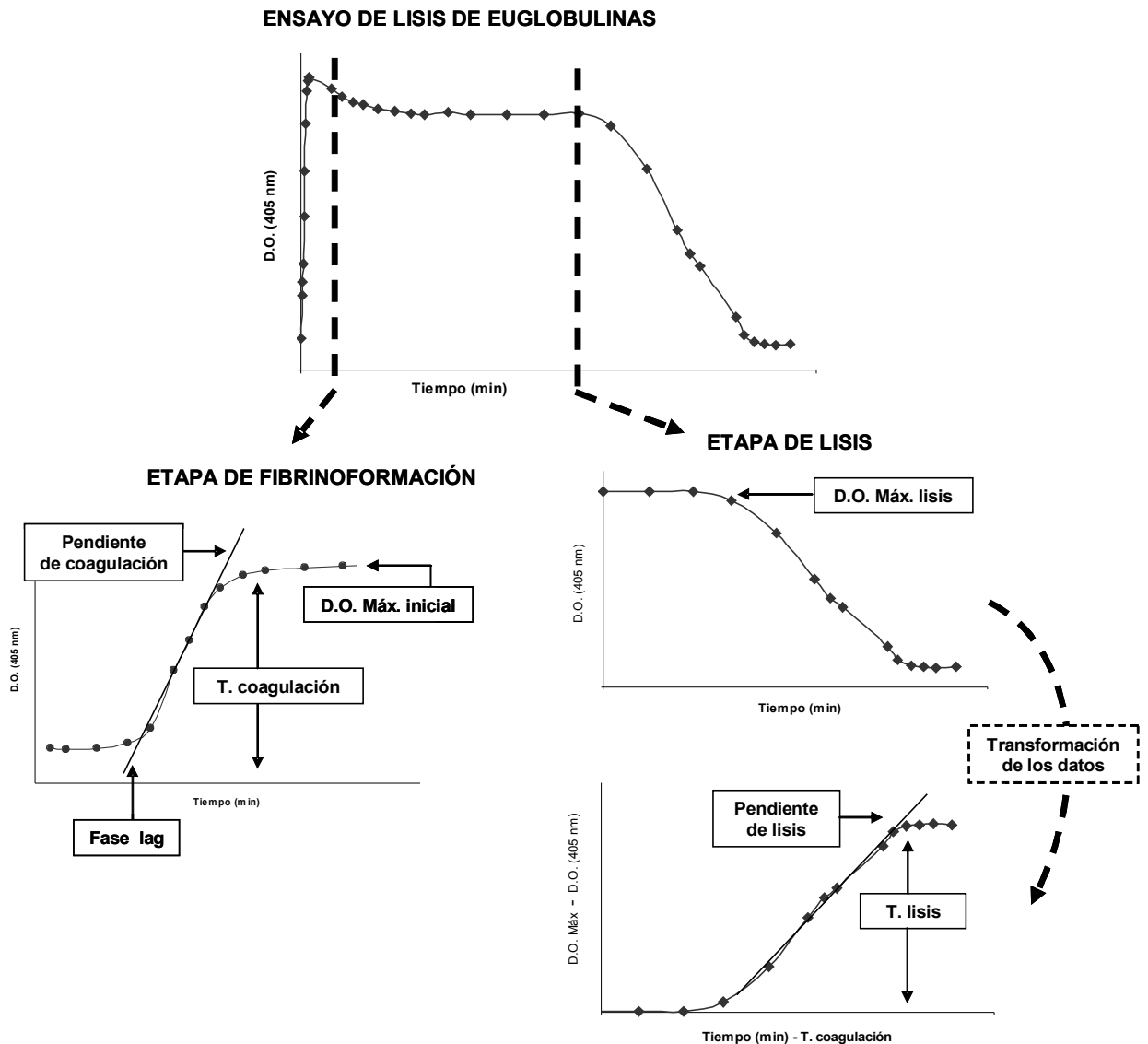
Con el objetivo de determinar si el dermatán sulfato presenta efecto anticoagulante y aumentar la sensibilidad para distinguir diferencias en el patrón de lisis, se diseñó una modificación de la prueba de lisis de euglobulinas para estudiar la etapa de fibrinoformación y lisis por espectrofotometría.

Se trabajó en policubetas de poliestireno incubando 100 µl de solución de euglobulinas (*pool* de euglobulinas) con 100 µl de solución de cloruro de calcio 0,025 M y registrando la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo hasta valor constante, utilizando un lector de ELISA. Todos los reactivos fueron estabilizados a 37 °C antes de comenzar el ensayo y durante el monitoreo de absorbancia las policubetas fueron conservadas en estufa a 37 °C.

Para evaluar el efecto del DSA y DSB, trabajando en policubetas de poliestireno se agregó 100 µl del *pool* de euglobulinas, 20 µl de una solución de DSA o DSB y se registró la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo a partir del agregado de 100 µl de solución de cloruro de calcio. Se utilizaron soluciones de DS de modo tal que la concentración final resultara 10, 50 y 100 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la

solución de DS por solución fisiológica. Cada ensayo completo se realizó por quintuplicado.

Se graficó la densidad óptica (D.O.) a 405 nm en función del tiempo y para analizar los resultados se evaluó por separado la etapa de fibrinoformación (aumento de D.O. hasta valor máximo constante) y la etapa de lisis del coágulo (descenso de D.O. hasta valor mínimo constante).



Para estudiar la etapa de fibrinoformación, se procedió como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos: Formación de redes de fibrina*.

Para estudiar la etapa de lisis se realizó una transformación de los datos corrigiendo el tiempo de lisis por el tiempo de coagulación determinado en la etapa de fibrinoformación (Tiempo - T. coagulación) y calculando los descensos de la densidad óptica respecto del

registro correspondiente al inicio de la lisis (D.O. Máx. lisis – D.O.). Las curvas sigmoideas obtenidas fueron caracterizadas mediante dos parámetros: la pendiente asociada a la velocidad de lisis (Pendiente de lisis) y el tiempo asociado a la disolución completa del coágulo (T. Lisis). Sólo fueron analizadas las curvas que no presentaban diferencias significativas respecto del ensayo control en la etapa de fibrinoformación.

El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios de cada parámetro en estudio de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney* para comparar los parámetros de las curvas obtenidas en presencia de DS respecto del control y un *p* valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para la comparación de los tiempos de lisis de euglobulinas (TLE) la hipótesis nula (H_0) fue $TLE_{Control} = TLE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $TLE_{Control} > TLE_{DS}$ y para la comparación de las velocidades de lisis de euglobulinas (VLE) la hipótesis nula (H_0) fue $VLE_{Control} = VLE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $VLE_{Control} < VLE_{DS}$.

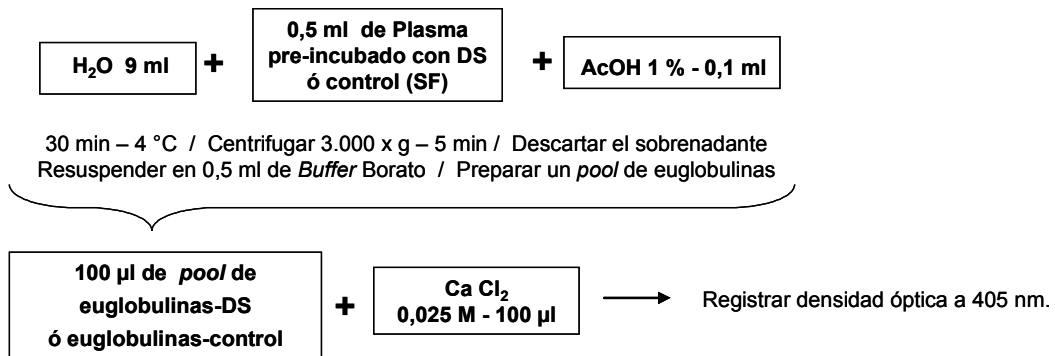
B.- Lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato

Se obtuvo sangre venosa de diez individuos voluntarios sanos, se preparó un *pool* de plasma normal y se procedió según se describe a continuación.

Se agregó una solución de DS al *pool* de plasma de modo que la concentración final de DSB resultara entre 10 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración final de DSA resultara entre 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó a 37 °C durante una hora. Del mismo modo se obtuvo el control correspondiente reemplazando la solución de DS por solución fisiológica.

Se precipitó la fracción de euglobulinas del plasma como fue descrito en la técnica original y a partir de los precipitados obtenidos en presencia de cada concentración de DS o control se preparó una solución mezcla: *pool* de euglobulinas-DS y *pool* de euglobulinas-control.

Luego, en policubetas de poliestireno se agregaron 100 μl de *pool* de euglobulinas-DS o euglobulinas-control y 100 μl de solución de cloruro de calcio 0,025 M y se registró la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo. Cada ensayo completo se realizó por quintuplicado.



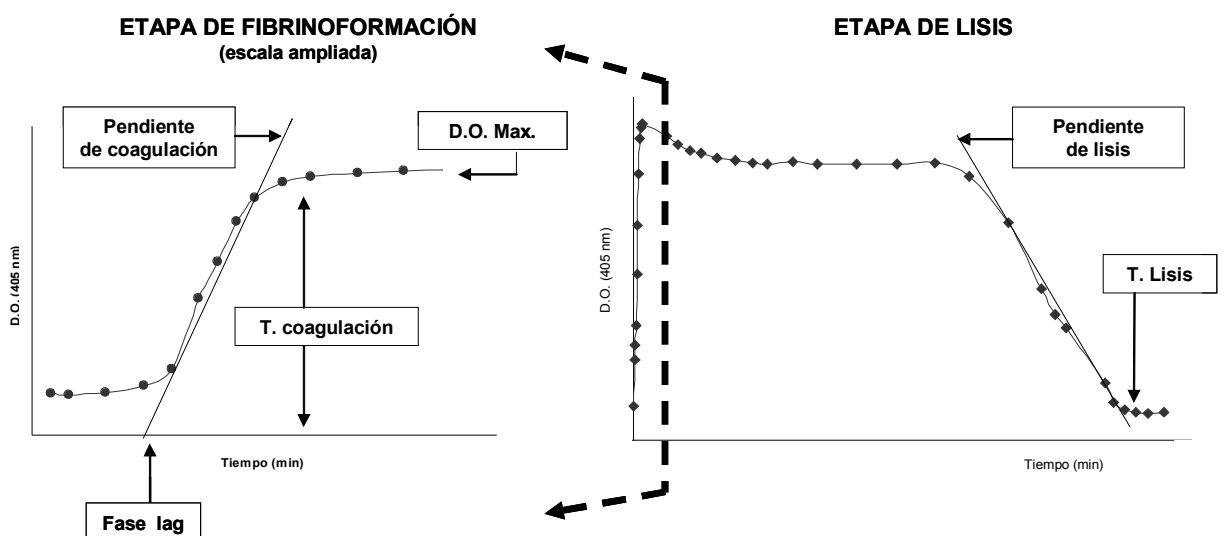
Esquema general del ensayo de lisis de euglobulinas

B: Efecto del dermatán sulfato sobre la precipitación y el tiempo de lisis de euglobulinas

Para analizar los resultados se evaluó por separado la etapa de fibrinoformación (aumento de D.O. hasta valor máximo constante) y la etapa de lisis del coágulo (descenso de D.O. hasta valor mínimo constante).

Las curvas de fibrinoformación se caracterizaron y evaluaron como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos: Formación de redes de fibrina*.

Para el análisis de la etapa de lisis las curvas fueron caracterizadas mediante dos parámetros: la pendiente asociada a la velocidad de lisis (Pendiente de lisis) y el tiempo asociado a la disolución completa del coágulo (T. Lisis). Todas las curvas fueron analizadas incluso las que presentaban diferencias significativas respecto del ensayo control en la etapa de fibrinoformación.



El análisis estadístico de los datos (Statistix) fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre los promedios de cada parámetro en estudio de los distintos grupos fueron comparadas utilizando el *test* de *Tukey*, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

En una segunda etapa se aplicó el *test* de *Mann-Whitney* para comparar los parámetros de las curvas obtenidas en presencia de DS respecto del control y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para la comparación de los tiempos de lisis de euglobulinas (TLE) la hipótesis nula (H_0) fue $TLE_{Control} = TLE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $TLE_{Control} > TLE_{DS}$ y para la comparación de las velocidades de lisis de euglobulinas (VLE) la hipótesis nula (H_0) fue $VLE_{Control} = VLE_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H_1) fue $|VLE_{Control}| < |VLE_{DS}|$.

Además, las soluciones obtenidas a partir de los precipitados en presencia de cada concentración de DS o control (*pool* de euglobulinas-DS o *pool* de euglobulinas-control) fueron caracterizadas mediante la determinación de:

- ✓ concentración proteica total por método de Lowry.
- ✓ patrón electroforético por SDS-PAGE (con y sin 2-ME).
- ✓ fibrinógeno por método de inmunodifusión radial (NOR-Partigen Fibrinogen, Behringwerke AG, Marburg, Alemania).
- ✓ plasminógeno por método amidolítico (Stachrom Plasminogen, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia).
- ✓ antitrombina III por método amidolítico (Antitrombin III, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- ✓ cofactor II de la heparina por método amidolítico (Stachrom Heparin Cofactor II, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia).
- ✓ productos de degradación de fibrina o fibrinógeno por método de aglutinación de latex (FDP-Latex Agglutination, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia).
- ✓ dímero D por método de aglutinación de latex (D-Di-Latex Agglutination Test, Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia).

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL

Se planteó como objetivo evaluar el efecto del dermatán sulfato sobre la expresión de los componentes fibrinolíticos en la célula endotelial. Se utilizó la línea celular 1G11, proveniente de células endoteliales de microvasculatura aisladas de pulmón de ratón BALB/C. Estas células presentan morfología tipo *cobblestone*, expresan constitutivamente CD₃₁, CD₃₄, VE-caderina, ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina y conservan el fenotipo y la morfología durante 5 meses de cultivo⁽¹³¹⁾.

Se estudió la acción del dermatán sulfato sobre las células endoteliales mencionadas, mediante la determinación de la actividad del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y de su inhibidor (PAI-1) ya que la célula endotelial es el sitio principal para la síntesis de estos componentes.

Reactivos

Los reactivos utilizados en las experiencias de cultivos celulares fueron provistos por Sigma (St. Louis, Montana, EE.UU.).

- ✓ Medio de cultivo: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).
- ✓ Solución de Hanks (*Balanced salt solution*).
- ✓ Suero fetal bovino (SFB, inactivado por calor).
- ✓ Suplemento para el crecimiento de la célula endotelial (ECGS; *endothelial cell growth supplement*).
- ✓ Solución antibiótica y antimicótica (100 x): Penicilina G (10.000 U/ml), Estreptomina (10 mg/ml) y Amfotericina B (25 µg/ml).
- ✓ Tripsina/EDTA (10 x): Tripsina 5 g/l, EDTA 2 g/l, en solución NaCl 0,9 % p/v.

Cultivos celulares

Se estandarizaron los cultivos de la línea celular 1G11, determinando la cantidad celular más conveniente para dosar t-PA y PAI-1 ante la estimulación con dermatán sulfato.

Los cultivos se realizaron en medio DMEM enriquecido con piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 1 % p/v y Hepes 2 % p/v; conteniendo además, 10 % de suero fetal bovino, 100-140 µg/ml de ECGS y una solución antibiótica y antimicótica.

Periódicamente los cultivos fueron controlados para detectar micoplasma.

Las células fueron sembradas en placas de Petri o botellas de cultivo tratadas previamente con gelatina y fueron incubadas a 37 °C en estufa con atmósfera humidificada (5 % de CO₂ y saturación con vapor de agua). El cambio de medio de cultivo se realizó 2 o 3 veces por semana, y al llegar a estado de confluencia, las células fueron dispersadas por tratamiento con tripsina/EDTA y lavadas con solución de Hanks, con 1 % de suero fetal bovino.

Se estimó el número de células en la suspensión celular obtenida y para la realización de la experiencia se sembraron placas de 6 pocillos (3,5 cm de diámetro), utilizando 10⁶ células por pocillo en medio DMEM enriquecido como fue detallado previamente sin agregado de ECGS. La experiencia se realizó por sextuplicado: las células se dejaron pegar a las placas durante 2 horas y luego fueron estimuladas con DSA de modo que la concentración final en la placa resultara 4 µg/ml. Como control se reemplazó la solución de DSA por solución fisiológica. Después de 19 horas de incubación se recogieron los sobrenadantes y las células fueron despegadas mecánicamente y lisadas por shock térmico.

Se determinó la actividad de t-PA y PAI-1 en los sobrenadantes y en los lisados celulares.

Determinación de t-PA y PAI-1

Para la determinación de t-PA y PAI-1 en ambos componentes del cultivo (sobrenadante y lisado celular) se utilizó un método amidolítico comercial: COASET-t-PA y COATEST-PAI (Chromogenix, Mölndal, Suecia).

A.- Principios para la determinación de t-PA

Para determinar la actividad de t-PA, se agrega a la muestra una cantidad estandarizada de plasminógeno y de un estimulador de t-PA (fragmentos de fibrina) y se mide la actividad amidolítica de la plasmina generada por acción del t-PA de la muestra sobre el plasminógeno agregado, sobre un sustrato cromogénico. La concentración de p-NA liberada determinada espectrofotométricamente a 405 nm correlaciona linealmente con la concentración de t-PA entre 0,25 y 10 UI/ml.

Muestra (t-PA) + Plg + estimulador de t-PA → Plm

Plm + sustrato cromogénico → péptido + p-NA

B.- Principios para la determinación de PAI-1

Para determinar la actividad de PAI-1, se agrega a la muestra una cantidad estandarizada y en exceso de t-PA, parte del cual forma rápidamente un complejo inactivo con el inhibidor

presente en la muestra. La actividad de t-PA residual se determina como se detalló anteriormente. La concentración de p-NA liberada determinada espectrofotométricamente a 405 nm es inversamente proporcional a la cantidad de PAI-1 presente en la muestra.

Muestra (PAI-1) + t-PA_{exceso} → t-PA_{residual}

t-PA_{residual} + Plg + estimulador de t-PA → Plm

Plm + sustrato cromogénico → péptido + p-NA

Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados (Statistix) se aplicó el *test* de *Mann-Whitney*. La hipótesis nula (H₀) fue $t-PA/PAI-1_{Control} = t-PA/PAI-1_{DS}$ y la hipótesis alternativa (H₁) fue $t-PA/PAI-1_{Control} \neq t-PA/PAI-1_{DS}$ y un *p* valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

ESTUDIO DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad biológica de los principales componentes del sistema fibrinolítico, trabajando con sistemas purificados y sustratos cromogénicos sintéticos.

El uso de sistemas purificados permitió evaluar los posibles efectos del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico de manera independiente de su conocido efecto anticoagulante y además analizar diferentes etapas de la activación de la fibrinólisis pudiendo de este modo proponer un mecanismo de acción.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO

La activación de plasminógeno a plasmina ocurre por la acción de diversos activadores que clivan el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del plasminógeno. Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno mediada por *el activador de plasminógeno de tipo urinario (u-PA) y el activador tisular del plasminógeno (t-PA)*.

Se utilizó un método amidolítico-cinético cuyo diseño, optimización y método de análisis de los resultados fue descripto detalladamente en la sección *Materiales y Métodos: Diseño y optimización de un método amidolítico-cinético para evaluar actividad de componentes del sistema fibrinolítico*. En líneas generales la reacción de activación se realizó incubando plasminógeno con el activador y el sustrato cromogénico S-2251, y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. Debido a que la concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de la plasmina formada por activación de plasminógeno, a partir del registro de absorbancia *versus* tiempo se evaluó la cinética de la reacción de activación.

Para estudiar el efecto del DSA y DSB se realizaron ensayos comparativos de actividad en ausencia (condiciones basales) y presencia de distintas concentraciones de dermatán sulfato, según se resume a continuación para cada activador utilizado. Para el análisis de los resultados las curvas de registro de datos fueron ajustadas con la ecuación sigmoidea y caracterizadas a partir de los parámetros “ $t_{1/2}$ ” que representa el tiempo asociado al 50 % de la reacción y “V” que representa la velocidad de reacción, y se calcularon los factores de potenciación correspondientes.

Como fue descripto en la sección *Materiales y Métodos* citada, el Plg y los activadores u-PA y t-PA no tienen acción directa sobre el sustrato S-2251 ya que los blancos realizados con la concentración máxima de Plg (Plg 0,46 μ M + S-2251), u-PA (u-PA 600 U/ml + S-2251) y t-PA (t-PA 200 U/ml + S-2251) utilizadas en ensayos de activación de plasminógeno no mostraron cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia. En esta etapa se realizaron nuevos controles en presencia de DSA y DSB (DSA/DSB + S-2251; Plg + DSA/DSB + S-2251; u-PA + DSA/DSB + S-2251; t-PA + DSA/DSB + S-2251) y se verificó que en ninguno de los casos hubo reacción directa sobre el sustrato cromogénico.

• ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR u-PA

La reacción de activación de plasminógeno se realizó incubando Glu-Plg (conc. final 0,3 μ M) con el sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) y u-PA (conc. final 10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de DSA o DSB (4 a 512 μ g/ml). Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades.

El dermatán sulfato potenció la activación de plasminógeno por u-PA y el efecto observado fue concentración dependiente. En las figuras 27 y 28 puede observarse que tanto en presencia de DSB como DSA disminuyó el tiempo asociado al 50 % de la reacción y aumentó la velocidad de reacción, y que el efecto fue mayor con DSA para la misma concentración estudiada.

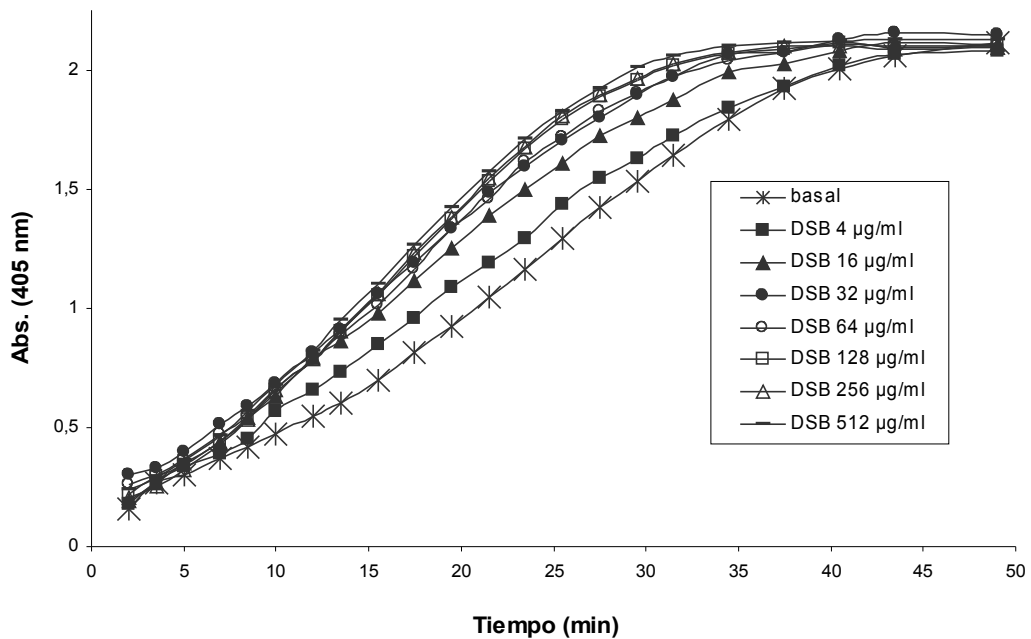


Figura 27: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por u-PA.

Basal = Glu-Plg 0,3 μ M; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

DSB = ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular entre 4 y 512 μ g/ml.

Cada figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

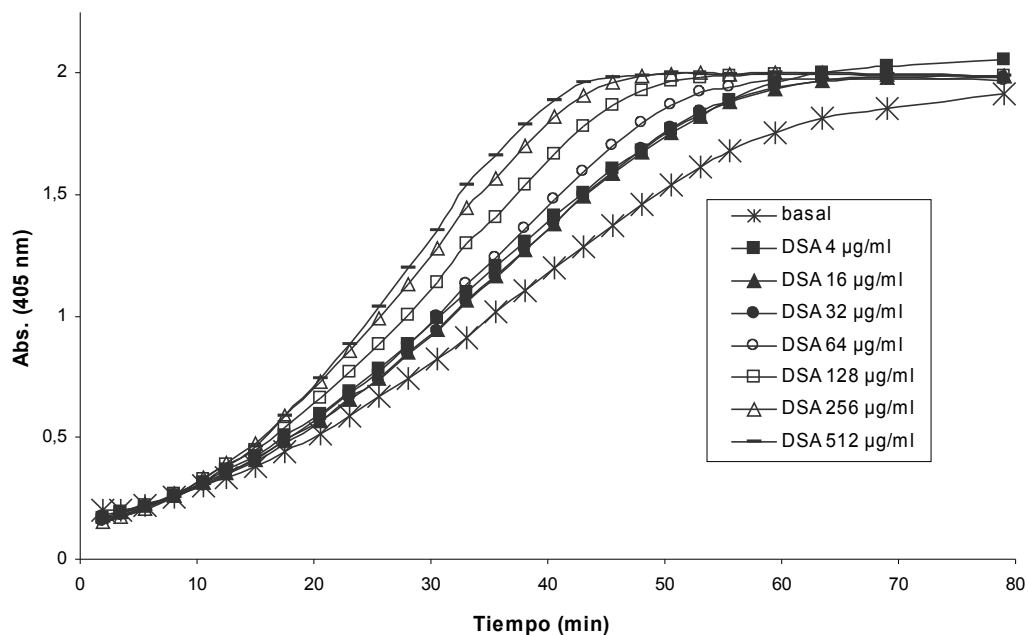


Figura 28: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la activación de plasminógeno por u-PA.

Basal = Glu-Plg 0,3 µM; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

DSA = ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular entre 4 y 512 µg/ml.

Cada figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$ calculados en función de la concentración de dermatán sulfato se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por u-PA. Factores de potenciación.

Concentración evaluada	DSB		DSA	
	f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$
4 µg/ml	1,00 ± 0,01	0,98 ± 0,08	1,02 ± 0,02	0,96 ± 0,05
16 µg/ml	1,08 ± 0,01	0,82 ± 0,08	1,07 ± 0,05	0,95 ± 0,05
32 µg/ml	1,23 ± 0,04 *	0,80 ± 0,05 *	1,13 ± 0,03 *	0,96 ± 0,03
64 µg/ml	1,32 ± 0,09 *	0,81 ± 0,05 *	1,27 ± 0,04 *	0,92 ± 0,04
128 µg/ml	1,30 ± 0,10 *	0,81 ± 0,05 *	1,45 ± 0,06 *	0,85 ± 0,02 *
256 µg/ml	1,30 ± 0,10 *	0,79 ± 0,05 *	1,62 ± 0,06 *	0,78 ± 0,02 *
512 µg/ml	1,36 ± 0,11 *	0,76 ± 0,06 *	1,73 ± 0,05 *	0,77 ± 0,02 *

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 µM, u-PA 10 U/ml, S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo (DSB) y alto peso molecular (DSA) entre 4 y 512 µg/ml.

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media ± error estándar ($n = 5$). Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo (*).

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) sobre la reacción de activación de plasminógeno utilizando diferentes concentraciones de u-PA (5, 10 y 50 U/ml).

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos y puede observarse que se corroboró el efecto potenciador del dermatán sulfato. En particular, el efecto del DSB resultó de similar magnitud para las diferentes concentraciones de u-PA utilizadas, mientras que el efecto del DSA fue de mayor magnitud a mayor concentración de u-PA, alcanzando un efecto máximo de aproximadamente 160 % de aumento de la velocidad de reacción y 40 % de reducción del tiempo asociado al 50 % de la reacción.

Tabla 2: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por diferentes concentraciones de u-PA.

Concentración evaluada		u-PA 5 U/ml		u-PA 10 U/ml		u-PA 50 U/ml	
		f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	$1,19 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,05$	$1,16 \pm 0,08$	$0,89 \pm 0,05$
	100	$1,25 \pm 0,05^*$	$0,96 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,05^*$	$0,81 \pm 0,03^*$	$1,29 \pm 0,06^*$	$0,83 \pm 0,02^*$
	500	$1,30 \pm 0,06^*$	$0,86 \pm 0,02^*$	$1,36 \pm 0,05^*$	$0,76 \pm 0,03^*$	$1,31 \pm 0,05^*$	$0,82 \pm 0,02^*$
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	$1,23 \pm 0,02^*$	$0,95 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,05^*$	$0,89 \pm 0,05$
	100	$1,56 \pm 0,09^*$	$0,86 \pm 0,02^*$	$1,46 \pm 0,05^*$	$0,85 \pm 0,02^*$	$2,25 \pm 0,05^*$	$0,68 \pm 0,05^*$
	500	$1,89 \pm 0,19^*$	$0,77 \pm 0,03^*$	$1,73 \pm 0,04^*$	$0,77 \pm 0,02^*$	$2,58 \pm 0,09^*$	$0,62 \pm 0,04^*$

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 μM , diferentes concentraciones de u-PA (5, 10 y 50 U/ml), S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) de dermatán sulfato de bajo (DSB) y alto peso molecular (DSA).

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$). Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Debido a que durante el ensayo de activación de plasminógeno se registró la actividad amidolítica global de la plasmina generada por acción de u-PA sobre el plasminógeno, el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251 podría deberse en parte a un aumento de la actividad de la plasmina generada.

Para dilucidar si el dermatán sulfato afecta la activación de plasminógeno de manera directa, se evaluó la conversión de plasminógeno a plasmina por electroforesis (SDS-PAGE con Urea). Para ello se incubó una solución de Glu-Plg (conc. final 1,5 μM) con u-PA como activador (conc. final 300 U/ml) y aprotinina (10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en ausencia y presencia de DSA o DSB (230 $\mu\text{g/ml}$). En función del tiempo se recogieron alícuotas de la mezcla de incubación y se mezclaron con *buffer* de muestra con 2-ME/SDS/Urea e incubaron a 100 °C para detener la reacción de activación.

La conversión de plasminógeno a plasmina fue evaluada por SDS-PAGE-Urea mediante la desaparición de la banda correspondiente a plasminógeno y la aparición de dos bandas correspondientes a la plasmina reducida. El u-PA no fue detectado en las concentraciones evaluadas.

En la figura 29 puede observarse que en presencia de dermatán sulfato la velocidad de conversión de plasminógeno en plasmina resultó mayor, destacándose la aparición de la banda correspondiente a plasmina a menor tiempo de incubación acompañada por la desaparición temprana de la banda de plasminógeno. Además, puede observarse que el efecto es mayor en presencia de DSA respecto de DSB, dato que coincide con los resultados de la evaluación por método amidolítico.

Cabe destacar que debido a que la reacción de activación fue realizada en presencia de aprotinina, se descarta la actividad autocatalítica de la plasmina formada sobre la activación de plasminógeno y por lo tanto, el efecto observado corresponde a la facilitación de la activación de plasminógeno por u-PA en presencia de dermatán sulfato.

Figura 29: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la conversión de plasminógeno a plasmina.

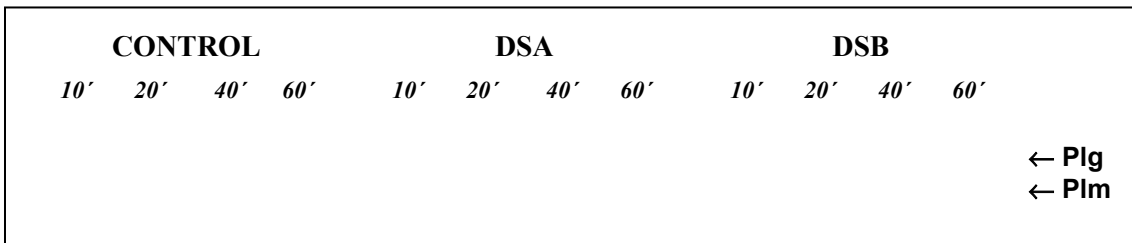
Electroforesis en poliacrilamida-SDS-Urea (T gel concentrador 4 %, T gel separador 8,6 %) según fue descrito en Materiales y Métodos.

CONTROL = Glu-Plg (1,5 μ M) y u-PA (300 U/ml) incubados en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 durante 10, 20, 40 y 60 minutos.

DSA o DSB = incubación realizada en presencia de 230 μ g/ml de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo peso molecular (DSB), respectivamente.

Plg = banda correspondiente a plasminógeno.

Plm = banda correspondiente a la cadena pesada de la plasmina post reducción con 2-ME.



Resumiendo, los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la reacción de activación de plasminógeno por u-PA fueron:

Dermatán Sulfato de bajo peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por u-PA en función del aumento de la concentración de DSB.
- ✓ El efecto potenciador fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo de similar magnitud para las distintas concentraciones de u-PA ensayadas (efecto

máximo observado: 35 % de aumento de la pendiente de activación y 25 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).

- ✓ Por electroforesis se comprobó la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina en presencia de DSB.

Dermatán Sulfato de alto peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por u-PA en función del aumento de la concentración de DSA.
- ✓ El efecto potenciador fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo la potenciación de mayor magnitud a mayor concentración de u-PA (efecto máximo observado: 160 % de aumento de la pendiente de activación y 40 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ Por electroforesis se comprobó la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina en presencia de DSA.

Los resultados de los estudios de activación de plasminógeno por u-PA por método amidolítico y electroforético apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico. Un mecanismo probable sería mediante potenciación de la activación de plasminógeno por u-PA.

• ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR t-PA

Se evaluó el efecto del DSA y DSB sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA. Teniendo en cuenta que, fisiológicamente, la activación de plasminógeno mediada por t-PA en medio plasmático es un proceso ineficiente y que en presencia de fibrina la reacción de activación está potenciada, se preparó un estimulador de t-PA soluble que pueda ser utilizado en ensayos funcionales amidolíticos de modo de estudiar la reacción de activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrina. En la sección *Materiales y Métodos* se describió detalladamente la preparación y caracterización de la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) seleccionada como estimulador soluble de t-PA para los ensayos *in vitro* de activación de plasminógeno.

La reacción de activación de plasminógeno se realizó incubando Glu-Plg (conc. final 0,3 μ M) con el sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) y t-PA (conc. final 10 U/ml)

en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de DSA o DSB (4 a 512 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo de estimulación, el ensayo fue realizado en presencia de PDF en concentración final 0,05 mg/ml. Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades.

Cabe destacar que se descartó actividad residual de plasmina en la solución de PDF utilizada ya que no se observó actividad amidolítica sobre el sustrato S-2251 a la concentración de trabajo seleccionada. Además, se realizaron nuevos controles en presencia de DSA y DSB (DSA/DSB + PDF + S-2251) y se verificó que en ninguno de los casos hubo reacción directa sobre el sustrato cromogénico.

En la figura 30 (A y B) puede observarse que el dermatán sulfato potenció la activación de plasminógeno por t-PA y que el efecto observado fue concentración dependiente. Puede observarse además, que en presencia de dermatán sulfato disminuyó el tiempo asociado al 50 % de la reacción y aumentó la velocidad de reacción. Por otro lado, en comparación con la acción de PDF, utilizado como control positivo de estimulación, el efecto observado en presencia de DSA resultó de similar magnitud mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud.

Los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$ calculados en función de la concentración de dermatán sulfato se resumen en la tabla 3. Puede observarse que el aumento de la velocidad de reacción resultó de aproximadamente 35 % en presencia de DSB y 170 % en presencia de DSA y que la reducción del tiempo asociado al 50 % de la reacción resultó de aproximadamente 40 % en presencia de DSB y 55 % en presencia de DSA.

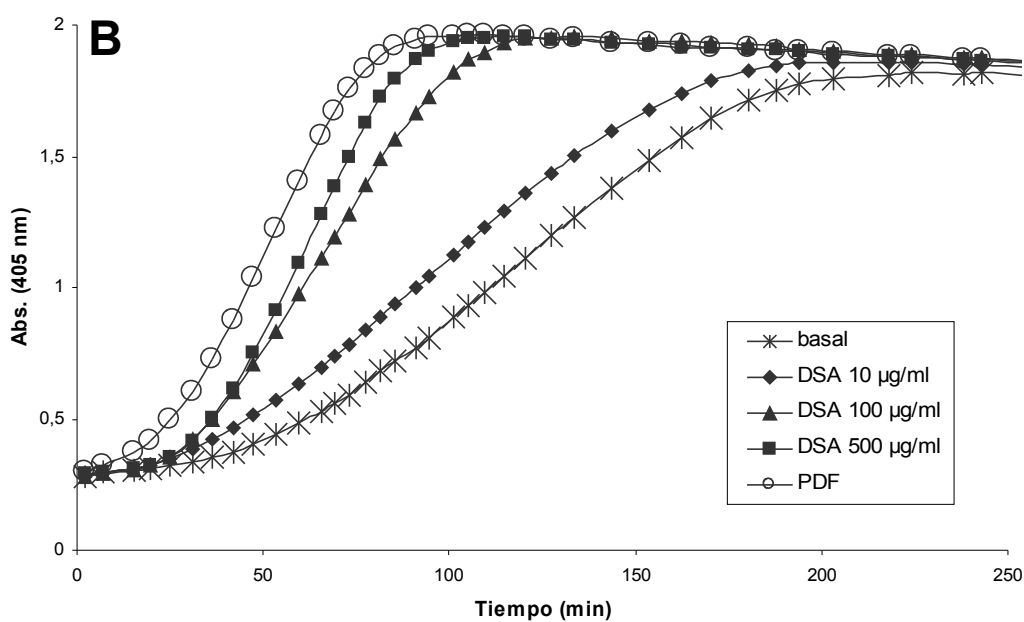
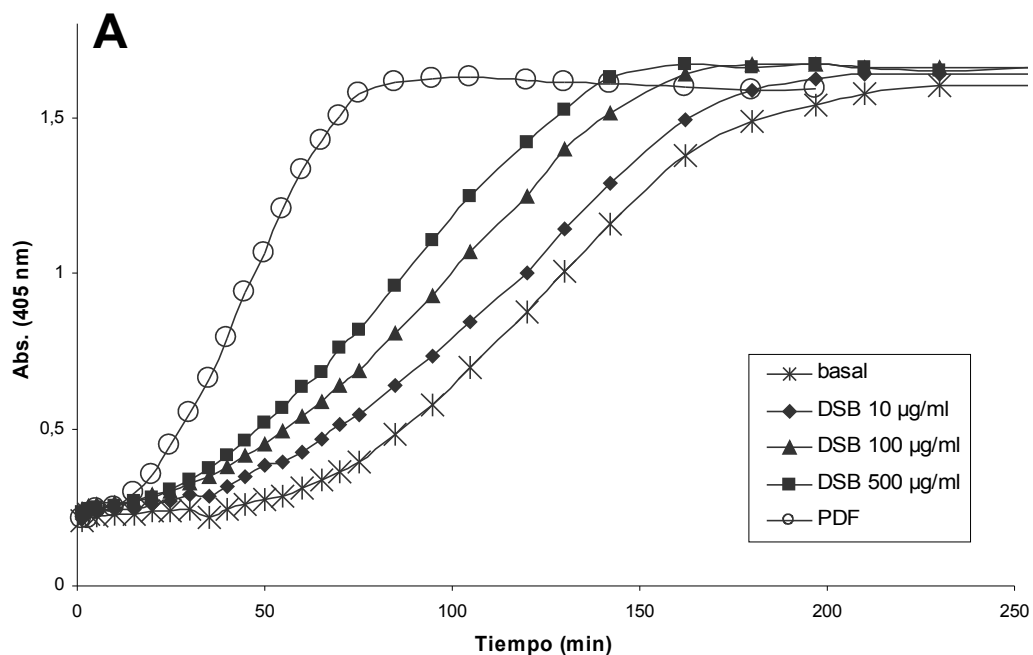


Figura 30: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por t-PA.

Basal = Glu-Plg 0,3 µM; t-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

A = ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (DSB) entre 10 y 500 µg/ml.

B = ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (DSA) entre 10 y 500 µg/ml.

PDF = control positivo de estimulación, ensayo en presencia de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (0,05 mg/ml).

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Tabla 3: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por t-PA. Factores de potenciación.

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 μ M, t-PA 10 U/ml, S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (entre 10 y 500 μ g/ml).

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$).

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular,

DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular, PDF = control positivo de estimulación, productos de degradación de fibrina y fibrinógeno.

Concentración evaluada		Factores de potenciación	
		f_v	$f_{t_{1/2}}$
Control	PDF	2,60 \pm 0,20 *	0,40 \pm 0,10 *
DSB (μ g/ml)	10	1,03 \pm 0,05	0,85 \pm 0,07
	100	1,13 \pm 0,07	0,73 \pm 0,05 *
	500	1,35 \pm 0,05 *	0,62 \pm 0,05 *
DSA (μ g/ml)	10	1,03 \pm 0,04	0,76 \pm 0,03 *
	25	1,31 \pm 0,07*	0,55 \pm 0,04 *
	50	1,81 \pm 0,15 *	0,50 \pm 0,03 *
	100	2,13 \pm 0,07*	0,50 \pm 0,03 *
	500	2,70 \pm 0,19 *	0,44 \pm 0,04 *

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 μ g/ml) sobre la reacción de activación de plasminógeno utilizando diferentes concentraciones de t-PA (5, 10 y 50 U/ml). En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos y puede observarse que se corroboró el efecto potenciador del dermatán sulfato. En particular, el efecto observado en presencia de DSB resultó de similar magnitud a las diferentes concentraciones de t-PA utilizadas, mientras que el efecto del DSA fue de mayor magnitud a mayor concentración de t-PA.

Tabla 4: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por diferentes concentraciones de t-PA.

Concentración evaluada		t-PA 5 U/ml		t-PA 10 U/ml		t-PA 50 U/ml	
		f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$
control	PDF	2,50 \pm 0,20 *	0,40 \pm 0,10 *	2,60 \pm 0,20 *	0,40 \pm 0,10 *	2,70 \pm 0,20 *	0,30 \pm 0,10 *
DSB (μ g/ml)	10	1,10 \pm 0,05	0,71 \pm 0,03 *	1,03 \pm 0,05	0,85 \pm 0,07	1,19 \pm 0,09	0,73 \pm 0,05 *
	100	1,12 \pm 0,07	0,67 \pm 0,04 *	1,13 \pm 0,07	0,73 \pm 0,05 *	1,24 \pm 0,05 *	0,71 \pm 0,07 *
	500	1,30 \pm 0,01 *	0,62 \pm 0,04 *	1,35 \pm 0,05 *	0,62 \pm 0,05 *	1,33 \pm 0,03 *	0,66 \pm 0,06 *
DSA (μ g/ml)	10	0,92 \pm 0,09	0,89 \pm 0,04	1,03 \pm 0,04	0,76 \pm 0,03 *	0,96 \pm 0,03	0,65 \pm 0,08 *
	100	1,80 \pm 0,16 *	0,56 \pm 0,03 *	2,13 \pm 0,07*	0,50 \pm 0,03 *	2,11 \pm 0,06 *	0,52 \pm 0,07 *
	500	2,31 \pm 0,11*	0,52 \pm 0,05 *	2,70 \pm 0,19 *	0,44 \pm 0,04 *	2,94 \pm 0,11 *	0,46 \pm 0,06 *

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 μ M, diferentes concentraciones de t-PA (5, 10 y 50 U/ml), S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (10, 100 y 500 μ g/ml).

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$).

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular, PDF = control positivo de estimulación, productos de degradación de fibrina y fibrinógeno.

Como fue detallado previamente se preparó un estimulador de t-PA soluble (PDF) para estudiar el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrina, simulando las condiciones fisiológicas de activación.

Con el objetivo de evaluar el efecto combinado de dermatán sulfato y PDF se estudió la reacción de activación de plasminógeno por diferentes concentraciones de t-PA (5, 10 y 50 U/ml) en presencia de 0,05 mg/ml de PDF y diferentes concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 µg/ml).

En las figuras 31 y 32 puede observarse que el efecto combinado dermatán sulfato/PDF no fue aditivo, ya que en presencia de PDF el dermatán sulfato no presentó efecto estimulador adicional sobre la reacción de activación de plasminógeno a ninguna de las concentraciones de t-PA ensayadas.

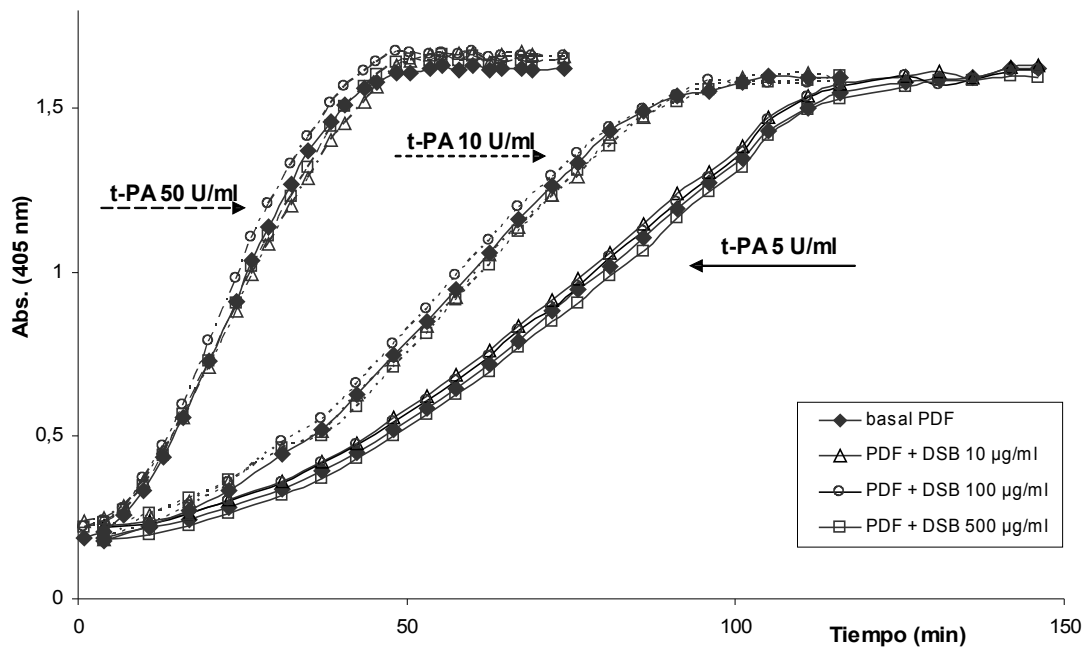


Figura 31: Efecto del dermatán sulfato de bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrina.

Ensayo de activación = Glu-Plg (0,3 µM), t-PA (5, 10 o 50 U/ml), S-2251 (0,5 mM) y PDF (0,05 mg/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Ensayo en ausencia (símbolos llenos ◆) y presencia (símbolos vacíos) de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (DSB) (△ 10 µg/ml, ○ 100 µg/ml and □ 500 µg/ml).

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

PDF = productos de degradación de fibrina y fibrinógeno.

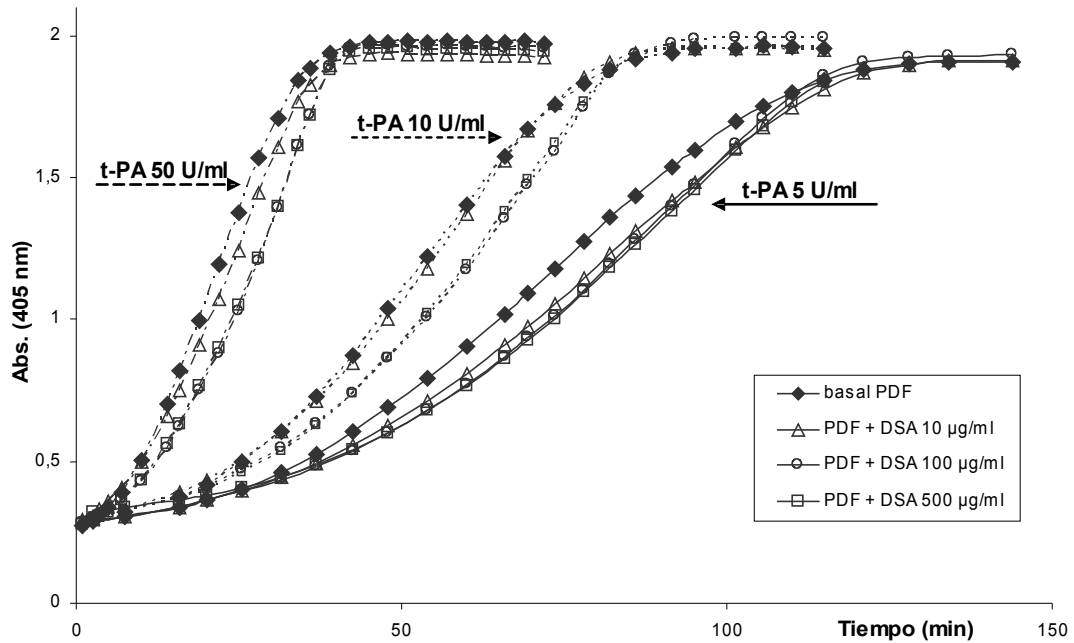


Figura 32: Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la activación de plasminógeno por t-PA en presencia de fibrina.

Ensayo de activación = Glu-Plg (0,3 µM), t-PA (5, 10 o 50 U/ml), S-2251 (0,5 mM) y PDF (0,05 mg/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Ensayo en ausencia (símbolos llenos \blacklozenge) y presencia (símbolos vacíos) de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (DSA) (Δ 10 µg/ml, \circ 100 µg/ml and \square 500 µg/ml).

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

PDF = productos de degradación de fibrina y fibrinógeno.

Resumiendo, los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA fueron:

Dermatán Sulfato de bajo peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA en función del aumento de la concentración de DSB.
- ✓ El efecto potenciador fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo de similar magnitud para las distintas concentraciones de t-PA ensayadas (efecto máximo observado: 35 % de aumento de la pendiente de activación y 40 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ No se observó efecto estimulador adicional de DSB sobre la reacción de activación de plasminógeno en presencia de PDF a ninguna de las concentraciones de t-PA ensayadas.

Dermatán Sulfato de alto peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA en función del aumento de la concentración de DSA.
- ✓ El efecto potenciador fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo la potenciación de mayor magnitud a mayor concentración de t-PA (efecto máximo observado: 190 % de aumento de la pendiente de activación y 55 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ No se observó efecto estimulador adicional de DSA sobre la reacción de activación de plasminógeno en presencia de PDF a ninguna de las concentraciones de t-PA ensayadas.

Los resultados de los estudios de activación de plasminógeno por t-PA por método amidolítico apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico. Un mecanismo probable sería mediante potenciación de la activación de plasminógeno por t-PA.

Cabe destacar que el efecto potenciador observado en presencia de DSA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno utilizados como control positivo de estimulación, mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud.

Por otro lado, la combinación de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de plasminógeno por t-PA, sugiriendo que ambas sustancias compartirían los sitios de acción sobre la molécula de t-PA y/o plasminógeno.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PLASMINA

Los resultados obtenidos en las experiencias anteriores apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico, siendo un mecanismo probable su acción potenciadora sobre la activación de plasminógeno.

Debido a que durante el ensayo de activación de plasminógeno se registró la actividad amidolítica de la plasmina generada por acción de los activadores del plasminógeno (u-PA o t-PA) sobre el plasminógeno, el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251 observado en presencia de dermatán sulfato podría deberse a un aumento de la reacción de activación de plasminógeno propiamente dicha y/o a un aumento de la actividad de la plasmina formada.

Si bien, se comprobó por electroforesis (SDS-PAGE con Urea) la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina acompañada de la desaparición de la banda de plasminógeno en presencia de DSA y DSB, durante la reacción de activación de plasminógeno por u-PA, para asignar con certeza el efecto observado al proceso de activación es necesario descartar que el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251 se deba a un aumento de la actividad de plasmina. Con el objetivo de dilucidarlo, se estudió la actividad de plasmina preformada en presencia de dermatán sulfato por hidrólisis directa del sustrato S-2251, utilizando un método amidolítico-cinético cuyo diseño, optimización y método de análisis de los resultados fue descrito detalladamente en la sección *Materiales y Métodos: Diseño y optimización de un método amidolítico-cinético para evaluar actividad de componentes del sistema fibrinolítico*.

Para estudiar el efecto del DSA y DSB se realizaron ensayos comparativos de actividad en ausencia (condiciones basales) y presencia de distintas concentraciones de dermatán sulfato, según se resume a continuación. La reacción amidolítica se realizó incubando Plm (conc. final 0,15 μ M) y sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de la plasmina, por lo tanto a partir del registro de absorbancia *versus* tiempo se evaluó la actividad de esta enzima.

La concentración de plasmina fue seleccionada como la cantidad correspondiente al 50 % de conversión de plasminógeno durante los ensayos de activación realizados con los diferentes activadores.

En la figura 33 puede observarse que el dermatán sulfato modificó levemente la actividad de plasmina.

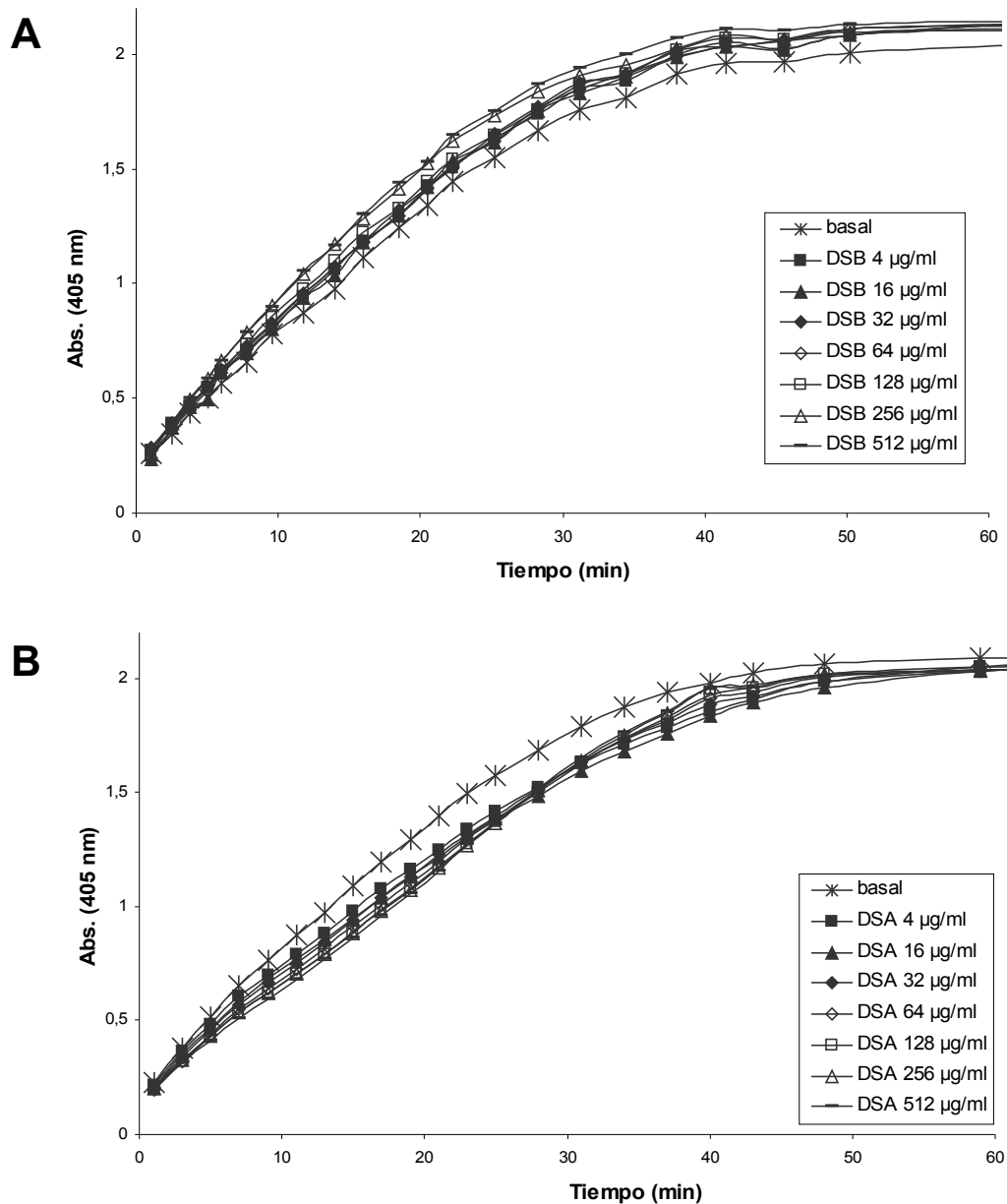


Figura 33: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de plasmina.

Basal = Plm 0,15 µM; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

A y B = ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de bajo (DSB) y alto (DSA) peso molecular entre 4 y 512 µg/ml, respectivamente. Cada figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades. Para el análisis de los resultados se calculó la velocidad inicial (V_0) como la pendiente de la recta tangente a tiempo inicial de cada curva de registro de datos y los factores de potenciación f_{V_0} calculados en función de la concentración de dermatán sulfato se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de plasmina. Factores de potenciación.

Ensayo de actividad de plasmina = Plm 0,15 μ M, S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (entre 4 y 512 μ g/ml). DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los factores de potenciación (f_{V_0}) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$). Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Concentración evaluada	DSB (f_{V_0})	DSA (f_{V_0})
4 μ g/ml	1,03 \pm 0,02	0,89 \pm 0,05
16 μ g/ml	1,06 \pm 0,03	0,88 \pm 0,05
32 μ g/ml	1,07 \pm 0,02 *	0,87 \pm 0,04 *
64 μ g/ml	1,11 \pm 0,02 *	0,87 \pm 0,04 *
128 μ g/ml	1,13 \pm 0,03 *	0,86 \pm 0,05 *
256 μ g/ml	1,19 \pm 0,04 *	0,84 \pm 0,05 *
512 μ g/ml	1,18 \pm 0,04 *	0,85 \pm 0,05 *

Para interpretar la magnitud de los resultados obtenidos se expresó el efecto máximo observado con cada forma de dermatán sulfato en función de la actividad de plasmina. El aumento máximo observado en presencia de DSB indicaría que cuando se agregó 500 μ g/ml de DSB a una solución de plasmina correspondiente al 50 % de conversión de plasminógeno en los ensayos de activación, la actividad de plasmina detectada fue de 57 % \pm 4 %; mientras que cuando se agregó 500 μ g/ml de DSA, la actividad de plasmina detectada fue de 43 % \pm 4 %. Por lo tanto podría considerarse que el dermatán sulfato no presenta un efecto significativo sobre la actividad de plasmina ya que la actividad biológica se modificó solo 7 %.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 μ g/ml) sobre la actividad de diferentes concentraciones de plasmina. Se utilizaron concentraciones de plasmina correspondiente al 25, 50 y 100 % de conversión de plasminógeno durante los ensayos de activación realizados con los diferentes activadores (0,075 - 0,15 y 0,30 μ M respectivamente).

En la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos y puede observarse que los efectos observados para ambas formas de dermatán sulfato resultaron de similar magnitud a las diferentes concentraciones de plasmina utilizadas.

Tabla 6: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de diferentes concentraciones de plasmina.

Concentración evaluada		0,075 μ M (25 %) (f_{v_0})	0,15 μ M (50 %) (f_{v_0})	0,3 μ M (100 %) (f_{v_0})
DSB (μ g/ml)	10	0,99 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03	1,02 \pm 0,05
	100	1,10 \pm 0,04 *	1,13 \pm 0,02 *	1,15 \pm 0,04 *
	500	1,19 \pm 0,05 *	1,20 \pm 0,03 *	1,25 \pm 0,07 *
DSA (μ g/ml)	10	0,80 \pm 0,05 *	0,83 \pm 0,02 *	0,78 \pm 0,03 *
	100	0,78 \pm 0,07 *	0,78 \pm 0,04 *	0,81 \pm 0,06 *
	500	0,75 \pm 0,08 *	0,79 \pm 0,06 *	0,80 \pm 0,06 *

Ensayo de actividad de plasmina = Diferentes concentraciones de plasmina (0,075, 0,15 y 0,30 μ M), S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (10, 100 y 500 μ g/ml). DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los factores de potenciación (f_{v_0}) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$).

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Resumiendo, se observó que el dermatán sulfato no tiene un efecto significativo sobre la actividad de plasmina ya que cuando se evaluó la actividad de plasmina correspondiente a 50 % de conversión en el ensayo de activación de plasminógeno (Plm 0,15 μ M) en presencia de dermatán sulfato (500 μ g/ml), la actividad detectada fue aproximadamente 57 % y 43 % para DSB y DSA respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos a otras concentraciones de plasmina ensayadas (0,075 y 0,3 μ M).

Debido a que se descartó que el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251, observado durante la reacción de activación de plasminógeno en presencia de dermatán sulfato, se deba a un aumento de la actividad amidolítica de plasmina, se concluye que el efecto pro-fibrinolítico del dermatán sulfato podría ser atribuido a un aumento sobre el proceso de activación de plasminógeno propiamente dicho.

EFFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO

Los resultados obtenidos en experiencias anteriores apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico, siendo un mecanismo probable la acción potenciadora sobre la activación de plasminógeno.

Sin embargo, debido a que durante el ensayo de activación de plasminógeno se registró la actividad amidolítica de la plasmina generada por acción de los activadores del plasminógeno, para dilucidar si el dermatán sulfato afecta la activación de plasminógeno de manera directa, se estudió la actividad de plasmina preformada en presencia de dermatán sulfato por hidrólisis directa del sustrato S-2251. Se descartó que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad amidolítica de plasmina.

Además, se estudió la conversión de plasminógeno a plasmina por electroforesis (SDS-PAGE con Urea) comprobando la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina acompañada de la desaparición de la banda de plasminógeno en presencia de DSA y DSB.

En esta etapa se consideró la posibilidad de que el dermatán sulfato aumentara la actividad de los activadores del plasminógeno. Para ello, se evaluó el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de u-PA por hidrólisis directa del sustrato S-2444. El procedimiento empleado y el método de análisis de los resultados fue descrito detalladamente en la sección *Materiales y Métodos: Diseño y optimización de un método amidolítico-cinético para evaluar actividad de componentes del sistema fibrinolítico*.

Para estudiar el efecto del DSA y DSB se realizaron ensayos comparativos de actividad en ausencia (condiciones basales) y presencia de dermatán sulfato (500 µg/ml), según se resume a continuación. La reacción amidolítica se realizó incubando u-PA (150 U/ml) y sustrato cromogénico S-2444 (conc. final 0,5 mM) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica de u-PA, por lo tanto a partir del registro de absorbancia *versus* tiempo se evaluó la actividad de esta enzima. Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en tres oportunidades.

En la figura 34 puede observarse que no se registraron cambios en la hidrólisis del sustrato cromogénico S-2444 por u-PA en presencia de 500 µg/ml de DSA o DSB ($f_{v_0} = 1,08 \pm 0,03$ y $f_{v_0} = 1,04 \pm 0,04$ para DSA y DSB respectivamente, media \pm error estándar, $n = 3$).

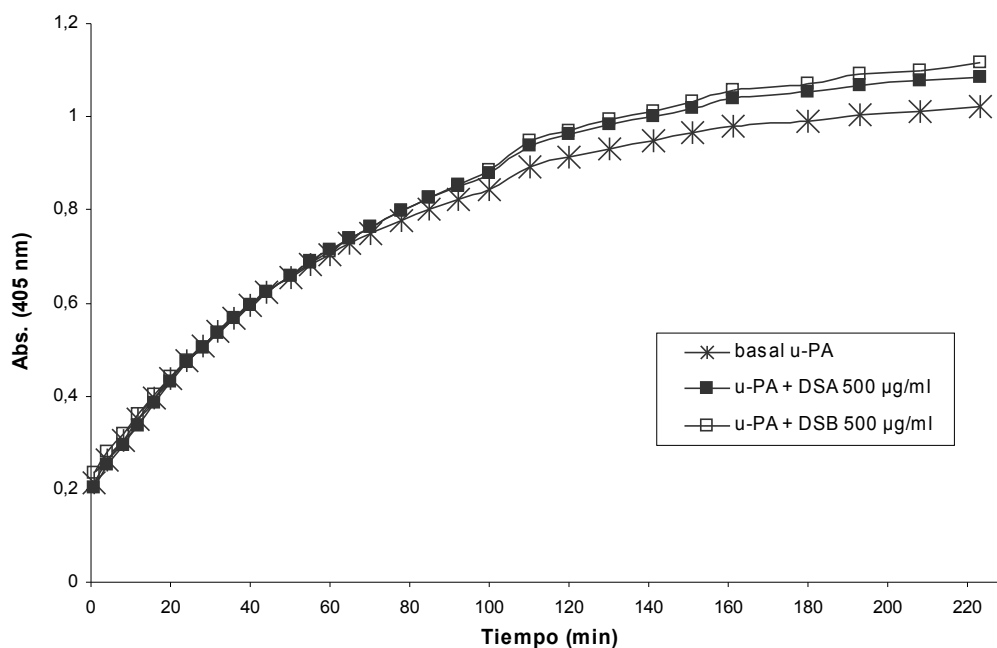


Figura 34: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de u-PA.

Basal u-PA= u-PA 150 U/ml; S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

u-PA + DSA/DSB = ensayo en presencia de 500 µg/ml de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo peso molecular (DSB).

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

En una segunda etapa se estudió la acción de DSA y DSB sobre la actividad amidolítica de u-PA en presencia de plasmina para evaluar el efecto de dermatán sulfato en la etapa de conversión de scu-PA en tcu-PA.

Como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos* citada, si bien se utilizó u-PA extraído de orina humana y la forma activa de u-PA o tcu-PA es la forma principal en que este activador se encuentra en orina, en este ensayo se evaluó la posibilidad de que el efecto del dermatán sulfato sea sobre la conversión *in vitro* de restos de pro-enzima o scu-PA en la forma activa de u-PA en presencia de la plasmina formada durante el ensayo de activación de plasminógeno.

En la figura 35 puede observarse que en presencia de plasmina la actividad amidolítica de u-PA resultó mayor, si bien la plasmina presentó mínima acción de hidrólisis del sustrato S-2444 (blanco de Plm). Esta diferencia de actividad estaría asociada a la conversión *in vitro* de scu-PA a tcu-PA en el ensayo realizado (aproximadamente 10 a 15 % de scu-PA).

En la figura 35 también puede observarse que no se registraron cambios en la hidrólisis del sustrato cromogénico S-2444 por u-PA en presencia de plasmina y de 500 µg/ml de DSA o

DSB ($f_v = 1,08 \pm 0,03$ y $f_v = 1,04 \pm 0,04$ para DSA y DSB respectivamente, media \pm error estándar, $n = 3$), por lo tanto el dermatán sulfato no afecta la conversión *in vitro* de scu-PA a tcu-PA en el ensayo realizado.

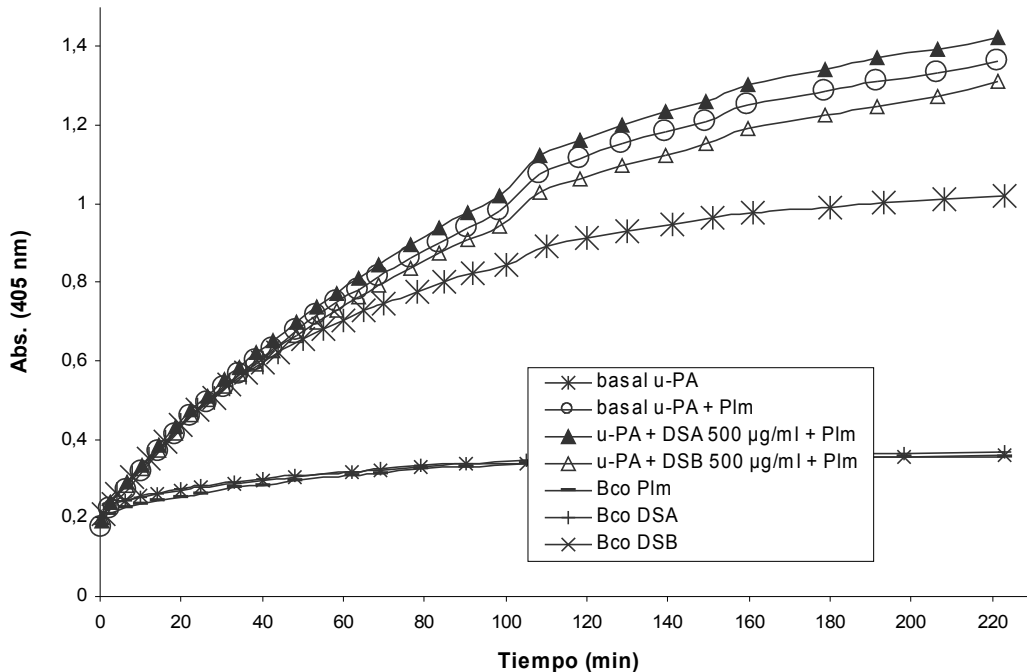


Figura 35: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de u-PA en presencia de plasmina.

Basal u-PA= u-PA 150 U/ml; S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Basal u-PA + Plm= u-PA 150 U/ml; Plm 2 nM (Plm); S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

u-PA + DSA/DSB + Plm = ensayo en presencia de Plm y 500 µg/ml de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo peso molecular (DSB).

Blanco Plm = Plm 2 nM; S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Blanco DSA/DSB = DSA/DSB 500 µg/ml; S-2444 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Resumiendo, se observó que el dermatán sulfato no modificó la actividad amidolítica de u-PA y que la conversión, por acción de plasmina, de u-PA de simple cadena (scu-PA) a doble cadena (tcu-PA) tampoco fue influenciada por dermatán sulfato.

Se descartó que el dermatán sulfato modifique la actividad amidolítica de u-PA o la conversión de pro-uroquinasa (scu-PA) a uroquinasa activa (tcu-PA).

Si bien no se evaluó el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad amidolítica de t-PA, teniendo en cuenta que la magnitud del efecto observado en los ensayos de

activación de plasminógeno por u-PA y t-PA fue similar, podría descartarse que el efecto pro-fibrinolítico del dermatán sulfato se deba a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno.

Por lo tanto, debido a que se descartó que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad de plasmina o a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno, se concluye que el efecto pro-fibrinolítico del dermatán sulfato se debería a una acción sobre el proceso de activación de plasminógeno. Sería posible que el efecto observado se deba a algún cambio conformacional que facilite el acceso de los activadores del plasminógeno al sitio de activación.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Lys-PLASMINÓGENO

Los resultados obtenidos durante los estudios amidolíticos de activación de plasminógeno realizados, apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico. Debido a que fue descartado que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad de plasmina o a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno, se concluyó que el dermatán sulfato potenciaría el proceso de activación de plasminógeno. Teniendo en cuenta que, en condiciones fisiológicas, el plasminógeno nativo (Plg o Glu-Plg) presenta una configuración cerrada de tipo *prolate elipsoid* que por interacción a través de sus sitios LBS con la fibrina cambia a una conformación *abierta* y flexible que resulta más fácilmente activada por los activadores de plasminógeno, sería posible que el aumento observado sobre la activación de plasminógeno por dermatán sulfato se deba a un cambio conformacional que facilite el acceso de los activadores del plasminógeno al sitio de activación. En particular, esta hipótesis está basada en el hecho de que el dermatán sulfato estimuló con una magnitud similar la activación de plasminógeno tanto por t-PA como por u-PA.

El Lys-Plg es obtenido por proteólisis plasmínica del plasminógeno nativo en los enlaces Arg₆₈-Met₆₉, Lys₇₇-Lys₇₈ o Lys₇₈-Val₇₉. A diferencia del Glu-Plg que presenta una configuración cerrada (debido a la interacción no covalente entre la porción N-terminal y los sitios LBS presentes en los *kringles*), el Lys-Plg presenta una configuración abierta ya que no posee la porción N-terminal. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el Lys-Plg representa la configuración abierta del plasminógeno, para evaluar la hipótesis planteada se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plg por los diferentes activadores utilizados.

El Lys-Plg fue obtenido por incubación de Glu-Plg con plasmina y caracterizado por electroforesis y mediante ensayos funcionales amidolíticos de activación como fue descrito detalladamente en la sección *Materiales y Métodos: Preparación y caracterización de Lys-Plasminógeno*.

Para estudiar el efecto del DSA y DSB se realizaron ensayos comparativos de actividad en ausencia (condiciones basales) y presencia de dermatán sulfato (500 µg/ml), según se resume a continuación. La reacción de activación se realizó incubando Lys-Plg (conc. final 0,3 µM) con el sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) y u-PA o t-PA (conc.

final 10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades.

Paralelamente, como control positivo de estimulación, el ensayo de activación con t-PA fue realizado en presencia de la mezcla de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) en concentración final 0,05 mg/ml.

En la sección *Materiales y Métodos* citada se describieron detalladamente el procedimiento empleado, el método de análisis de los resultados y los blancos realizados como controles del procedimiento de preparación y activación de Lys-Plg. En esta etapa se evaluó el efecto del DSA y DSB sobre el blanco de Lys-Plg (Lys-Plg + DSA/DSB + S-2251) verificando que en ninguno de los casos hubo efecto significativo. Este resultado coincide con los resultados presentados previamente respecto de que el dermatán sulfato no afectó la actividad de plasmina.

Para el análisis de los resultados las curvas de registro de datos fueron ajustadas con la ecuación sigmoidea y caracterizadas a partir de los parámetros “ $t_{1/2}$ ” que representa el tiempo asociado al 50 % de la reacción y “V” que representa la velocidad de reacción.

En la figura 36 puede observarse que el dermatán sulfato presentó efecto estimulador sobre la reacción de activación de Lys-Plg por u-PA. De manera similar al efecto observado sobre Glu-Plg el efecto con DSA fue mayor que con DSB.

La velocidad de reacción aumentó aproximadamente 30 % en presencia de DSB y 110 % en presencia de DSA y el tiempo asociado al 50 % de la reacción disminuyó aproximadamente 15 % en presencia de DSB y 30 % en presencia de DSA (tabla7).

En la figura 37 se presentan los resultados del efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA. Al igual que para el estudio de la reacción de activación de Glu-Plg, el efecto potenciador observado en presencia de DSA resultó de magnitud similar a la acción de PDF, utilizado como control positivo de estimulación, mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud.

La velocidad de reacción aumentó aproximadamente 40 % en presencia de DSB y 180 % en presencia de DSA y el tiempo asociado al 50 % de la reacción disminuyó aproximadamente 15 % en presencia de DSB y 30 % en presencia de DSA (Tabla 7).

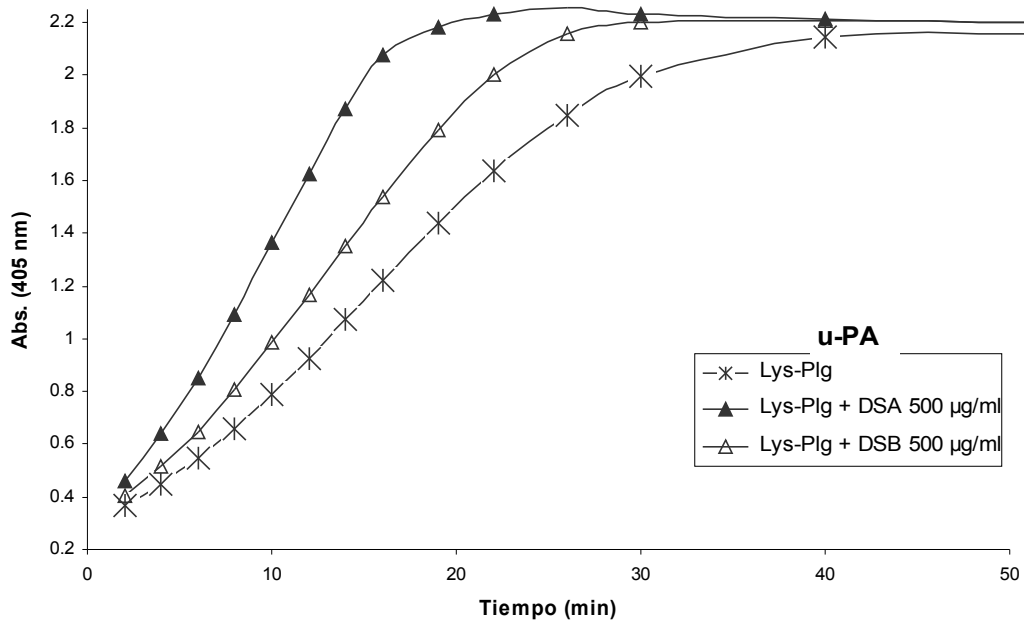


Figura 36: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de Lys-plasminógeno por u-PA.

Lys-Plg = Lys-Plg 0,3 µM; u-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.
 Lys-Plg + DSA/DSB = ensayo con Lys-Plg en presencia de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo (DSB) peso molecular. La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

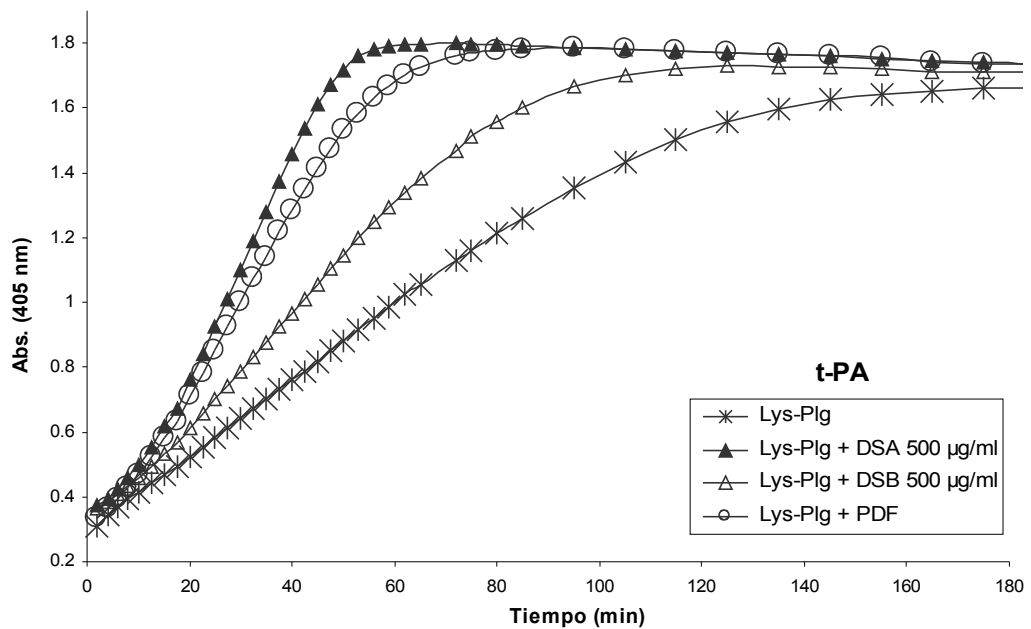


Figura 37: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de Lys-plasminógeno por t-PA.

Lys-Plg = Lys-Plg 0,3 µM; t-PA 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.
 Lys-Plg + DSA/DSB = ensayo con Lys-Plg en presencia de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo (DSB) peso molecular. Lys-Plg + PDF = ensayo con Lys-Plg en presencia de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF).
 La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

En una segunda etapa se estudió el efecto combinado dermatán sulfato/PDF y se observó que en presencia de PDF el dermatán sulfato no presentó efecto estimulador adicional sobre la reacción de activación de Lys-Plg (tabla 7).

Tabla 7: Efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plasminógeno por u-PA y t-PA.

Lys-Plasminógeno fue activado por u-PA o t-PA (10 U/ml) en presencia de 500 µg/ml de DSA o DSB. El ensayo de activación con t-PA también fue realizado en presencia de PDF (0,05 mg/ml). Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$).

		f_v	$f_{t_{1/2}}$
u-PA	DSB	1,29 \pm 0,05 *	0,84 \pm 0,02 *
	DSA	2,11 \pm 0,04 *	0,69 \pm 0,03 *
t-PA	PDF (control)	2,21 \pm 0,19 *	0,69 \pm 0,05 *
	DSB	1,43 \pm 0,05 *	0,85 \pm 0,02 *
	DSA	2,79 \pm 0,21 *	0,71 \pm 0,05 *
	PDF + DSB	2,13 \pm 0,14 *	0,68 \pm 0,04 *
	PDF + DSA	2,81 \pm 0,21 *	0,71 \pm 0,05 *

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular, PDF = control positivo de estimulación, productos de degradación de fibrina y fibrinógeno.

Resumiendo, si el dermatán sulfato sólo potenciara la reacción de activación de plasminógeno favoreciendo el cambio conformacional de la forma *cerrada* a la forma *abierta*, no deberíamos observar potenciación durante el ensayo de activación de Lys-Plg. Sin embargo, los resultados del estudio del efecto del DSA y DSB sobre la reacción de activación de Lys-Plg por u-PA y t-PA fueron:

Dermatán Sulfato de bajo peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de Lys-Plg por u-PA (efecto observado: 30 % de aumento de la pendiente de activación y 15 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ Se observó un aumento de la activación de Lys-Plg por t-PA (efecto observado: 40 % de aumento de la pendiente de activación y 15 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ No se observó efecto estimulador adicional de DSB sobre la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA en presencia de PDF.

Dermatán Sulfato de alto peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de Lys-Plg por u-PA (efecto observado: 110 % de aumento de la pendiente de activación y 40 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ Se observó un aumento de la activación de Lys-Plg por t-PA (efecto observado: 180 % de aumento de la pendiente de activación y 30 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).
- ✓ No se observó efecto estimulador adicional de DSA sobre la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA en presencia de PDF.

Por lo tanto, debido a que los efectos observados en presencia de dermatán sulfato sobre la reacción de activación de Lys-Plg fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg, se descarta la hipótesis planteada de que el efecto del dermatán sulfato sobre la activación de plasminógeno se deba a un cambio conformacional del plasminógeno nativo de la forma “cerrada” a la forma “abierta”.

Cabe destacar que el efecto potenciador observado en presencia de DSA sobre la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA y u-PA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno utilizados como control positivo de estimulación en la reacción de activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud.

Por otro lado, la combinación de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de Lys-Plg por t-PA, sugiriendo que ambas sustancias compartirían los sitios de acción sobre la molécula de t-PA y/o plasminógeno y, en particular, que no estaría involucrada la porción N-terminal del Glu-Plg.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO POR ESTREPTOQUINASA

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno (Glu-Plg y Lys-Plg) mediada por un activador exógeno de uso terapéutico denominado *estreptoquinasa (SK)*. Si bien la estreptoquinasa no es un activador fisiológico, se lo seleccionó debido a que su mecanismo de activación es diferente al mecanismo mediado por t-PA y u-PA. Por lo tanto, el análisis del efecto del dermatán sulfato en la reacción de activación por SK podría permitirnos dilucidar detalles de su mecanismo de acción en la etapa de activación de plasminógeno en general.

Se utilizó un método amidolítico-cinético cuyo diseño, optimización y método de análisis de los resultados fue descrito detalladamente en la sección *Materiales y Métodos: Diseño y optimización de un método amidolítico-cinético para evaluar actividad de componentes del sistema fibrinolítico*. En líneas generales, la reacción de activación se realizó incubando Plg con SK y el sustrato cromogénico S-2251, y se monitoreó la liberación de p-NA (absorbancia a 405 nm) en función del tiempo. La concentración de p-NA liberada es proporcional a la actividad amidolítica del complejo Plg/SK, por lo tanto a través del registro de absorbancia *versus* tiempo se evaluó la cinética de la reacción de activación.

Para estudiar el efecto del DSA y DSB se realizaron ensayos comparativos de actividad en ausencia (condiciones basales) y presencia de distintas concentraciones de dermatán sulfato, según se resume a continuación. Para el análisis de los resultados las curvas de registro de datos fueron ajustadas con la ecuación sigmoidea y caracterizadas a partir de los parámetros “ $t_{1/2}$ ” que representa el tiempo asociado al 50 % de la reacción y “V” que representa la velocidad de reacción, y se calcularon los factores de potenciación correspondientes.

Como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos* citada, la SK no tienen acción directa sobre el sustrato S-2251 ya que el blanco realizado con la concentración máxima de SK (SK 600 U/ml + S-2251) utilizada en ensayos de activación de plasminógeno no mostró cambios de absorbancia durante el desarrollo de la experiencia. En esta etapa se realizaron nuevos controles en presencia de DSA y DSB (SK + DSA/DSB + S-2251) y se verificó que en ninguno de los casos hubo reacción directa sobre el sustrato cromogénico.

• ACTIVACIÓN DE Glu-PLASMINÓGENO POR SK

La reacción de activación de plasminógeno se realizó incubando Glu-Plg (conc. final 0,3 μ M) con el sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) y SK (conc. final 10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de DSA o DSB (4 a 512 μ g/ml). Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades.

El DSB potenció la activación de Glu-Plg por SK y el efecto observado fue concentración dependiente. En la figura 38 puede observarse que en presencia de DSB disminuyó el tiempo asociado al 50 % de la reacción y aumentó la velocidad de reacción.

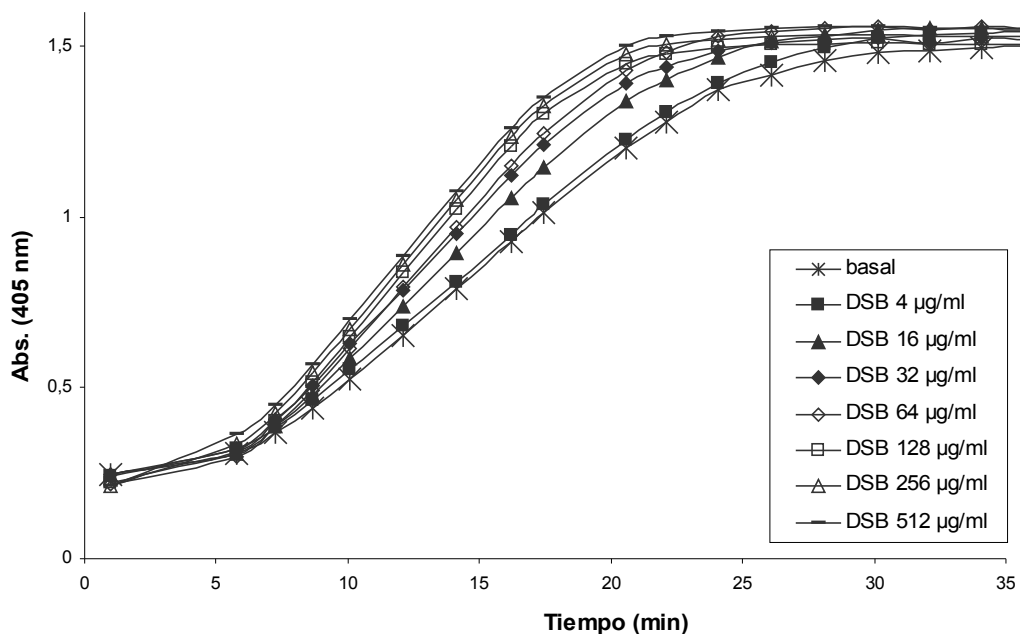


Figura 38: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por SK.

Basal = Glu-Plg 0,3 μ M; SK 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (DSB) entre 4 y 512 μ g/ml.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Por otro lado, en la figura 39 puede observarse que el DSA inhibió la reacción de activación de plasminógeno por SK y el efecto observado fue concentración dependiente. En presencia de DSA aumentó el tiempo asociado al 50 % de la reacción y disminuyó la velocidad de reacción.

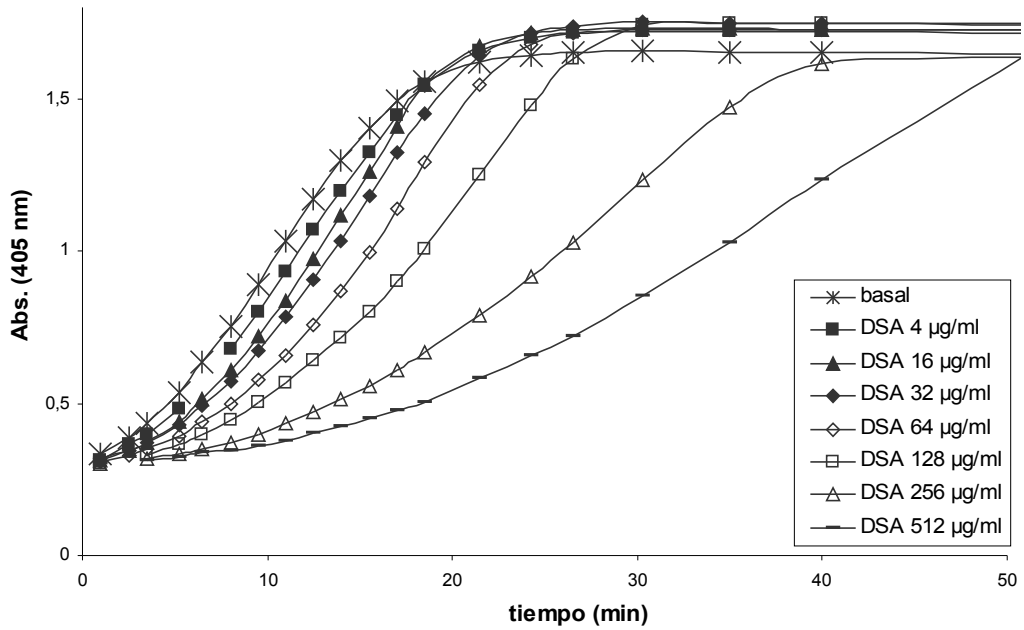


Figura 39: Efecto de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la activación de plasminógeno por SK.

Basal = Glu-Plg 0,3 µM; SK 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Ensayo en presencia de concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (DSA) entre 4 y 512 µg/ml.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$ calculados en función de la concentración de dermatán sulfato se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de plasminógeno por SK. Factores de potenciación.

Concentración evaluada	DSB		DSA	
	f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$
4 µg/ml	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,02	1,02 ± 0,03	1,07 ± 0,03
16 µg/ml	1,05 ± 0,04	0,95 ± 0,03	0,98 ± 0,06	1,18 ± 0,03 *
32 µg/ml	1,19 ± 0,04 *	0,91 ± 0,05 *	0,99 ± 0,04	1,31 ± 0,04 *
64 µg/ml	1,24 ± 0,03 *	0,90 ± 0,04 *	0,99 ± 0,04	1,57 ± 0,04 *
128 µg/ml	1,38 ± 0,04 *	0,89 ± 0,03 *	0,90 ± 0,06 *	1,85 ± 0,05 *
256 µg/ml	1,37 ± 0,03 *	0,90 ± 0,04 *	0,71 ± 0,06 *	2,32 ± 0,12 *
512 µg/ml	1,38 ± 0,04 *	0,89 ± 0,04 *	0,57 ± 0,04 *	2,84 ± 0,10 *

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 µM, SK 10 U/ml, S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (entre 4 y 512 µg/ml). DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media ± error estándar ($n = 5$).

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo (*).

Puede observarse que en presencia de DSB el aumento de la velocidad de reacción resultó de aproximadamente 40 % y la reducción del tiempo asociado al 50 % de la reacción resultó de aproximadamente 10 %, mientras que en presencia de DSA la velocidad de reacción disminuyó aproximadamente 40 % y el tiempo asociado al 50 % de la reacción aumento aproximadamente 180 %.

En una segunda etapa se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DSA y DSB (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$) sobre la reacción de activación de Glu-Plg utilizando diferentes concentraciones de SK (5, 10 y 50 U/ml).

Los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$ calculados en función de la concentración de dermatán sulfato se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la activación de Glu-Plg por diferentes concentraciones de SK.

Concentración evaluada		SK 5 U/ml		SK 10 U/ml		SK 50 U/ml	
		f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$	f_v	$f_{t_{1/2}}$
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	$1,05 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,02$	$1,06 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,03$
	100	$1,15 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,03^*$	$0,93 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,03^*$	$0,92 \pm 0,02^*$
	500	$1,30 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,03^*$	$1,35 \pm 0,04^*$	$0,90 \pm 0,03^*$	$1,35 \pm 0,05^*$	$0,89 \pm 0,02^*$
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	$0,97 \pm 0,04$	$1,22 \pm 0,06^*$	$1,00 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,04$
	100	$0,56 \pm 0,06^*$	$2,09 \pm 0,18^*$	$0,80 \pm 0,05^*$	$1,83 \pm 0,08^*$	$1,02 \pm 0,05$	$1,62 \pm 0,09^*$
	500	$0,26 \pm 0,05^*$	$4,09 \pm 0,45^*$	$0,44 \pm 0,05^*$	$3,17 \pm 0,16^*$	$0,70 \pm 0,07^*$	$2,73 \pm 0,15^*$

Ensayo de activación = Glu-Plg 0,3 μM , diferentes concentraciones de SK (5, 10 y 50 U/ml), S-2251 0,5 mM, *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato (10, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$). DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los factores de potenciación (f_v y $f_{t_{1/2}}$) fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos y los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$).

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Se corroboraron los efectos previamente observados en presencia de DSA y DSB sobre la reacción de activación de Glu-Plg por SK. En particular, el efecto del DSB resultó de similar magnitud a las diferentes concentraciones de SK utilizadas, mientras que el efecto del DSA fue de mayor magnitud a menor concentración de SK, alcanzando un efecto máximo de aproximadamente 75 % de disminución de la velocidad de reacción y 310 % de aumento del tiempo asociado al 50 % de la reacción.

Resumiendo, los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la reacción de activación de plasminógeno por SK fueron:

Dermatán Sulfato de bajo peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por SK en función del aumento de la concentración de DSB.
- ✓ El efecto potenciador fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo de similar magnitud para las distintas concentraciones de SK ensayadas (efecto máximo observado: 35 % de aumento de la pendiente de activación y 10 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).

Dermatán Sulfato de alto peso molecular:

- ✓ Se observó una disminución de la activación de plasminógeno por SK en función del aumento de la concentración de DSA.
- ✓ El efecto inhibitorio fue corroborado a distintas concentraciones del activador, siendo la inhibición de mayor magnitud a menor concentración de SK (efecto máximo observado: 75 % de disminución de la pendiente de activación y 310 % de aumento del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).

Durante la reacción de activación de plasminógeno por SK todos los dominios de la molécula de SK participan en la formación del complejo con plasminógeno. Por lo tanto, teniendo en cuenta la diferencia entre el efecto observado en presencia de DSA y DSB, podría descartarse la interacción directa entre SK y dermatán sulfato, ya que en ese caso ambas formas de dermatán sulfato deberían haber tenido el mismo efecto.

Además, el efecto potenciador del DSB fue de similar magnitud a las diferentes concentraciones del activador utilizadas, sugiriendo que la interacción sería con la molécula de plasminógeno.

En función de los resultados obtenidos podría plantearse que la interacción DS-Plg no sería sobre el sitio de unión a SK en la molécula de plasminógeno, ya que en ese caso ambas formas de DS hubieran afectado la formación del complejo de activación. Incluso, sería probable que el dermatán sulfato interaccione con la molécula de plasminógeno en un sitio distinto pero cercano al sitio de unión a SK, de modo que el

DSA por su longitud interferiría en la formación del complejo de activación mientras que el DSB al tener menor longitud no afectaría esta etapa de la reacción.

• ACTIVACIÓN DE Lys-PLASMINÓGENO POR SK

La reacción de activación de plasminógeno se realizó incubando Lys-Plg (conc. final 0,3 μ M) con el sustrato cromogénico S-2251 (conc. final 0,5 mM) y SK (conc. final 10 U/ml) en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de DSA o DSB (500 μ g/ml). Cada ensayo completo fue realizado por duplicado y repetido en cinco oportunidades.

En la figura 40 se presentan los resultados del efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de Lys-Plg por SK. Puede observarse que, de modo similar a lo reportado previamente sobre Glu-Plg, el DSA presentó un efecto inhibitorio y el DSB presentó efecto estimulador.

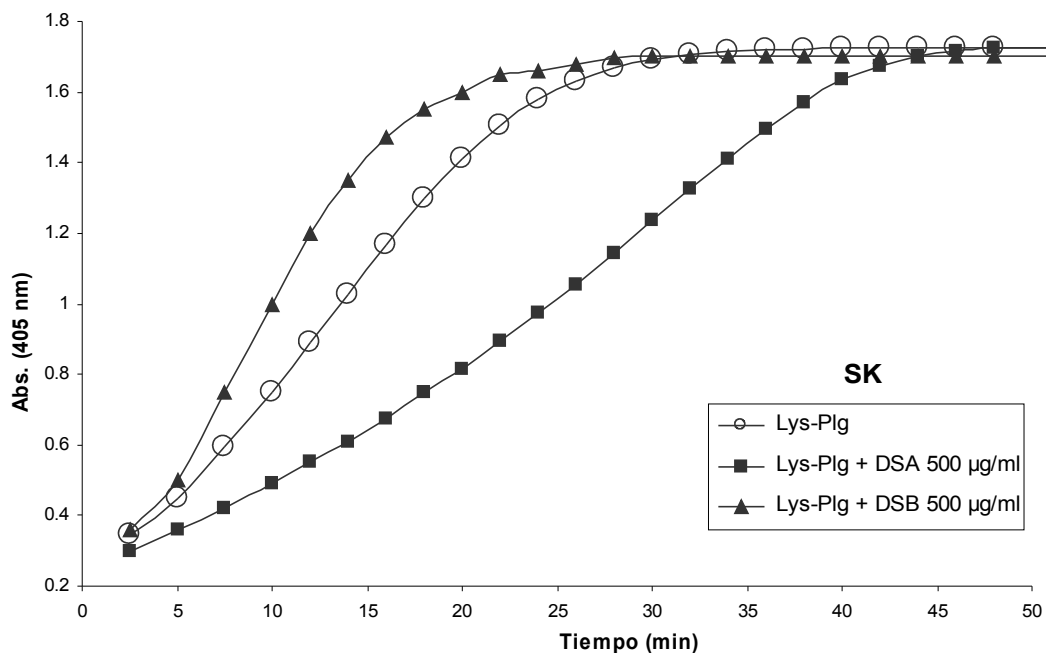


Figura 40: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la reacción de activación de Lys-plasminógeno por estreptoquinasa.

Lys-Plg = Lys-Plg 0,3 μ M; SK 10 U/ml; S-2251 0,5 mM; *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Lys-Plg + DSA/DSB = ensayo con Lys-Plg en presencia de dermatán sulfato de alto (DSA) o bajo (DSB) peso molecular.

La figura corresponde a un ensayo típico realizado por duplicado (sin error para facilitar la observación de los datos).

Para el análisis de los resultados se calcularon los factores de potenciación f_v y $f_{t_{1/2}}$ (media \pm error estándar, $n = 5$) y se aplicó el *test* de *Wilcoxon* (* = resultado estadísticamente significativo).

La velocidad de reacción aumentó aproximadamente 28 % en presencia de DSB ($f_v = 1,28 \pm 0,05$ *) y disminuyó 40 % en presencia de DSA ($f_v = 0,58 \pm 0,04$ *) y el tiempo asociado al 50 % de la reacción disminuyó aproximadamente 10 % en presencia de DSB ($f_{t_{1/2}} = 0,89 \pm 0,02$ *) y aumentó 130 % en presencia de DSA ($f_{t_{1/2}} = 2,27 \pm 0,15$ *).

Resumiendo, los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la reacción de activación de Lys-Plg por SK fueron:

Dermatán Sulfato de bajo peso molecular:

- ✓ Se observó un aumento de la activación de Lys-Plg por SK (efecto observado: 28 % de aumento de la pendiente de activación y 10 % de disminución del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).

Dermatán Sulfato de alto peso molecular:

- ✓ Se observó un efecto inhibitorio sobre la reacción de activación de Lys-Plg por SK (efecto observado: 40 % de disminución de la pendiente de activación y 130 % de aumento del tiempo asociado al 50 % de conversión de plasminógeno).

Es conocido que durante la reacción de activación de plasminógeno por SK el plasminógeno cambia su configuración “cerrada” a la forma “abierta” luego de unirse a la SK. En particular, si el DSB favoreciera la reacción de activación de plasminógeno debido a este cambio conformacional, no deberíamos observar potenciación durante el ensayo de activación de Lys-Plg.

Por lo tanto, debido a que los efectos observados sobre la reacción de activación de Lys-Plg fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg, se descarta la hipótesis planteada de que el efecto del dermatán sulfato se deba a un cambio conformacional del plasminógeno nativo de la forma “cerrada” a la forma “abierta”. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en los ensayos de activación de Lys-Plg por u-PA y t-PA.

DISCUSIÓN GENERAL

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de los principales componentes del sistema fibrinolítico, trabajando con sistemas purificados y sustratos cromogénicos sintéticos. Se observó un aumento de la reacción de activación de plasminógeno por t-PA y u-PA en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato. Este efecto fue corroborado a diferentes concentraciones de los activadores. En particular, el uso de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) como control positivo de estimulación en la reacción de activación por t-PA, permite señalar que el efecto máximo observado en presencia de DSA sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA y u-PA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de fibrina sobre la reacción de activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB, a la misma concentración estudiada, fue de menor magnitud. Además, la combinación de PDF y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de plasminógeno por t-PA.

Estos resultados coinciden con el efecto potenciador del dermatán sulfato observado en estudios *in vitro* de activación de plasminógeno por t-PA realizados por Kyogashima *et al.* ⁽¹⁰⁹⁾. Sin embargo, no se puede comparar de manera directa la magnitud de los factores de potenciación obtenidos debido a que el modo de análisis de los resultados es diferente (calculan velocidad inicial a partir de la pendiente de la curva de Abs_(405 nm) *versus* t²) y además, debido a que no informan resultados de estudios realizados en las mismas condiciones experimentales en presencia de fibrina. Por otro lado, el dermatán sulfato de origen bovino utilizado en el trabajo citado presenta un peso molecular de 16 kDa y resulta un producto intermedio entre el DSA (20-30 kDa) y DSB (3-5 kDa) utilizado en los estudios realizados en esta tesis. Al respecto, cabe destacar que si bien la mayoría de las preparaciones de DS disponibles son de origen bovino y porcino, presentan gran heterogeneidad química y diferentes propiedades farmacológicas principalmente dependiendo del peso molecular ⁽⁵¹⁾ y la vía de administración ^(89,90).

En función de los resultados obtenidos, un mecanismo probable del efecto pro-fibrinolítico del DS sería su acción potenciadora sobre la activación de plasminógeno. Sin embargo, debido a que durante el ensayo de activación de plasminógeno se registró la actividad amidolítica de la plasmina formada, el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251 podría deberse en parte a un aumento de la actividad de la plasmina generada. Por lo tanto, para asignar con certeza el efecto observado al proceso de activación de plasminógeno se

evaluó el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de plasmina preformada. Se observó que el dermatán sulfato no tenía efecto apreciable sobre la actividad de plasmina ya que cuando se evaluó, en presencia de dermatán sulfato, la actividad de plasmina correspondiente a 50 % de conversión de plasminógeno en el ensayo de activación, la actividad detectada correspondía a 57 % y 43 % para DSB y DSA respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos a otras concentraciones de plasmina ensayadas. Por lo tanto, se descartó que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad de plasmina.

Además, se estudió la conversión de plasminógeno a plasmina por electroforesis (SDS-PAGE con Urea) comprobando la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina acompañada de la desaparición de la banda de plasminógeno en presencia de DSA y DSB. Cabe destacar que el efecto observado fue mayor con DSA, coincidentemente con los resultados de los estudios amidolíticos.

Por otro lado, se consideró la posibilidad de que el dermatán sulfato aumentara la actividad de los activadores del plasminógeno. Se observó que el dermatán sulfato no modificó la actividad amidolítica de u-PA y que la conversión, por acción de plasmina, de u-PA de simple cadena (scu-PA o pro-uroquinasa) a doble cadena (tcu-PA o uroquinasa activa) tampoco fue influenciada por dermatán sulfato. Si bien no se evaluó el efecto de dermatán sulfato sobre la actividad amidolítica de t-PA, teniendo en cuenta que la magnitud del efecto del dermatán sulfato en los ensayos de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA fue similar, podría concluirse que el efecto pro-fibrinolítico observado no sería atribuible a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno en general.

Por lo tanto, debido a que fue descartado que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad amidolítica de plasmina o a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno, se puede concluir que el dermatán sulfato potenciaría de manera directa el proceso de activación de plasminógeno.

Resultados similares fueron obtenidos con otros GAGs. Se ha reportado que la heparina, el heparán sulfato y el condroitín sulfato aumentan la activación de plasminógeno mediada por t-PA y u-PA ⁽¹³²⁻¹³⁹⁾. Estos GAGs no tienen efecto sobre la hidrólisis de S-2251 por plasmina ^(135,137,139), ni sobre la actividad amidolítica de u-PA o t-PA frente a sus respectivos sustratos cromogénicos sintéticos ⁽¹³²⁻¹³⁵⁾. Además, se ha reportado que los efectos combinados de heparina y PDF sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA no son aditivos ^(132,136).

En condiciones fisiológicas el plasminógeno nativo (Plg o Glu-Plg) presenta una configuración *cerrada* debido a la interacción no covalente entre la porción N-terminal y los sitios LBS presentes en los *kringles*, y que por interacción a través de sus sitios LBS con la fibrina cambia a una conformación *abierta* y flexible que resulta más fácilmente activada por los activadores de plasminógeno. Sería posible que el aumento observado sobre la activación de plasminógeno por dermatán sulfato se deba a un cambio conformacional que facilite el acceso de los activadores del plasminógeno al sitio de activación. En particular, esta hipótesis está basada en el hecho de que el dermatán sulfato estimuló con magnitud similar la activación de plasminógeno tanto por t-PA como por u-PA.

Para evaluar esta hipótesis se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plg por los diferentes activadores utilizados. Los efectos observados sobre la reacción de activación de Lys-Plg fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg. El efecto potenciador observado en presencia de DSA sobre la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA y u-PA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de PDF utilizados como control positivo de estimulación en la reacción de activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud.

Teniendo en cuenta que el Lys-Plg representa la configuración *abierta* del Glu-Plg, si no se hubiera observado efecto sobre la reacción de activación de Lys-Plg se podría haber concluido que el efecto del dermatán sulfato estaría relacionado con el cambio de configuración del Glu-Plg de su forma *cerrada* a la forma *abierta*. Sin embargo, debido a que también se observó un efecto potenciador del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plg se debería pensar en algún otro tipo de cambio conformacional o en una interacción directa entre el dermatán sulfato y los activadores del plasminógeno.

Otros GAGs, heparina y heparán sulfato, han mostrado comportamientos similares respecto de la reacción de activación de Lys-Plg por t-PA y u-PA, demostrando que la transición de la forma *cerrada* a la forma *abierta* del plasminógeno no sería la explicación del aumento observado sobre la reacción de activación ^(133,137).

Por otro lado, se observó que la combinación de PDF y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de Glu o Lys-Plg por t-PA, sugiriendo que ambas sustancias compartirían los sitios de unión sobre la molécula de t-PA y/o plasminógeno y, en particular que ese sitio de interacción no estaría relacionado con la porción N-terminal

del plasminógeno. Teniendo en cuenta los sitios de unión a fibrina en las moléculas de plasminógeno y t-PA, se podría especular que los sitios involucrados en la interacción con dermatán sulfato podrían ser los dominios *kringle 5* y *1* del plasminógeno y los dominios *kringle 2* y *finger* del t-PA.

En función de estos resultados, podría plantearse que de modo análogo al rol propuesto para la fibrina en el sistema fibrinolítico, el dermatán sulfato podría actuar como una superficie que permitiera la formación de un complejo trimolecular, Plg-DS-activador, facilitando y acelerando la conversión a plasmina.

En relación con esta hipótesis se ha reportado que la heparina se uniría a varios componentes del sistema fibrinolítico, en particular se uniría con alta afinidad al t-PA, u-PA y Lys-Plg y con menor afinidad al Glu-Plg⁽¹³⁷⁾. Se ha descrito que los sitios de unión a heparina en la molécula de t-PA coincidirían con los sitios de unión a fibrina, dominios *finger* y *kringle 2*, aunque el t-PA se uniría a fibrina principalmente a través del dominio *kringle 2* y a heparina principalmente a través del dominio *finger*⁽¹⁴⁰⁾. Se ha reportado un sitio de unión a heparina en el dominio *kringle* del u-PA⁽¹⁴¹⁾ y respecto del plasminógeno en el fragmento Val₄₄₂-Plg (*kringle 5* + dominio catalítico)⁽¹⁴²⁾.

Incluso, se ha planteado la hipótesis de que la heparina podría actuar como una superficie que uniera plasminógeno y t-PA, facilitando y acelerando la conversión a plasmina^(132,137). Aunque, Liang *et al.*⁽¹⁴³⁾ mostró que la estimulación de la activación de plasminógeno por t-PA no respondía a un modelo templado, y propuso que la heparina se uniría directamente al t-PA, provocando un cambio conformacional que favoreciera la interacción con plasminógeno.

Sobre la base de un mecanismo templado, podríamos explicar las diferencias observadas entre el efecto del DSA y DSB. En presencia de un molde o templado corto que no pudiera unir simultáneamente ambas moléculas (plasminógeno y activador), el efecto global de potenciación no podría tener lugar, sin embargo podría detectarse un efecto parcial debido a la interacción entre el templado y la enzima o el sustrato. Mientras que, en presencia de un templado suficientemente largo como para unir la enzima y el sustrato, la reacción de potenciación tendría lugar de manera eficiente. En particular, esta hipótesis está basada en el hecho de que en presencia de DSB el efecto observado fue de similar magnitud a distintas concentraciones de los activadores, mientras que en presencia de DSA el efecto potenciador aumentó su magnitud con el aumento de la concentración de los activadores.

El DSB se uniría solamente a la molécula de plasminógeno, mientras que el DSA se uniría simultáneamente al plasminógeno y al activador (tanto u-PA como t-PA).

Respecto de esta hipótesis, otros autores han reportado que el efecto de la heparina sería dependiente de su capacidad de unir simultáneamente t-PA y plasminógeno, y por lo tanto, dependería de la longitud del oligosacárido ⁽¹⁴⁴⁾. Los oligosacáridos de heparina más cortos interaccionarían con t-PA, mientras que los oligosacáridos de cadena larga podrían interactuar con t-PA y plasminógeno potenciando la conversión a plasmina ⁽¹⁴⁵⁾.

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno (Glu-Plg y Lys-Plg) mediada por el activador exógeno estreptoquinasa (SK). Teniendo en cuenta que el mecanismo de activación por SK es diferente al mecanismo mediado por t-PA y u-PA, el análisis de estos resultados nos permite evaluar los planteos realizados sobre el mecanismo de acción del dermatán sulfato en la etapa de activación de plasminógeno.

Se observó que el DSB potenció la reacción de activación de Glu-Plg por SK y que el DSA inhibió la reacción, ambos efectos de manera concentración dependiente.

Es sabido que durante la reacción de activación de plasminógeno por SK todos los dominios de la molécula de SK participan en la formación del complejo con plasminógeno⁽³⁰⁾. Por lo tanto, teniendo en cuenta la diferencia entre el efecto observado en presencia de DSA y DSB, podría descartarse la interacción directa entre SK y DS, ya que en ese caso ambas formas de dermatán sulfato deberían haber tenido el mismo efecto. Además, como el efecto de DSB fue de similar magnitud a las diferentes concentraciones del activador utilizadas, podría plantearse que la interacción sería con la molécula de plasminógeno.

Por otro lado, en función de estos resultados, podría proponerse que la interacción DS-Plg no sería sobre el sitio de unión a SK en la molécula de plasminógeno (*kringle 5*), ya que en ese caso ambas formas de dermatán sulfato hubieran afectado la formación del complejo de activación. Incluso, sería probable que el dermatán sulfato interaccione con la molécula de plasminógeno en un sitio distinto pero cercano al sitio de unión a SK, de modo que el DSA por su longitud interferiría en la formación del complejo de activación mientras que el DSB al tener menor longitud no afectaría esta etapa de la reacción.

En particular, la propuesta de que el dermatán sulfato interacciona con el plasminógeno esta sustentada por los datos obtenidos en los ensayos de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA. Además, teniendo en cuenta que los efectos combinados dermatán sulfato/PDF no resultaron aditivos se había propuesto que estarían involucrados los

mismos sitios de unión a fibrina (*kringle 5 y 1*). Integrando estos resultados con los obtenidos en el estudio de activación de plasminógeno por SK, podría especularse que el dermatán sulfato se uniría al plasminógeno a través del dominio *kringle 1*.

Por otro lado, los efectos observados sobre la reacción de activación de Lys-Plg por SK fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg. Estos resultados también coinciden con los obtenidos previamente en los ensayos de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA. Por lo tanto, la transición de la forma *cerrada* a la forma *abierta* del plasminógeno no sería la explicación del aumento observado sobre la reacción de activación de plasminógeno en presencia dermatán sulfato.

En síntesis, los resultados obtenidos durante los estudios amidolíticos de activación de plasminógeno realizados, apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico. El uso de sistemas purificados ha permitido separar el efecto anticoagulante de las posibles acciones fibrinolíticas del dermatán sulfato y analizar diferentes etapas del proceso de activación de la fibrinólisis.

El efecto pro-fibrinolítico del dermatán sulfato podría deberse a una acción potenciadora del proceso de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA. En particular, de modo análogo al rol propuesto para la fibrina en el sistema fibrinolítico, el dermatán sulfato podría actuar como una superficie que permitiera la formación de un complejo trimolecular, Plg-DS-activador, facilitando y acelerando la conversión a plasmina.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA FORMACIÓN, ESTRUCTURA Y LISABILIDAD DE REDES DE FIBRINA

Teniendo en cuenta que la velocidad global del proceso de lisis no sólo depende de la actividad de los componentes del sistema fibrinolítico, sino de las características de las fibras y la estructura de la red de fibrina a lisar, se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la formación y estructura de la fibrina.

Además, se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad fibrinolítica, evaluando la lisabilidad de redes de fibrina formadas a partir de plasma, sangre entera y fracción plasmática de euglobulinas, producto del balance entre la acción de los activadores e inhibidores fibrinolíticos y las características de la red a lisar.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA FORMACIÓN DE REDES DE FIBRINA

En esta sección se presentan los resultados de la evaluación del efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular en ensayos *in vitro* de **fibrinoformación por recalcificación del plasma (A)** y **por agregado de trombina (B)**.

Si bien el objetivo principal de esta tesis es determinar el efecto del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico, para poder interpretar los resultados de sus efectos sobre la actividad fibrinolítica por métodos coagulométricos, fue necesario abordar previamente el estudio del efecto del dermatán sulfato sobre la fibrinoformación para caracterizar su acción en esta etapa y poder discriminar entre un efecto anticoagulante y un efecto profibrinolítico neto en los ensayos de lisis.

A.- FORMACIÓN DE FIBRINA POR RECALCIFICACIÓN

Para caracterizar el efecto del DSA y DSB sobre la fibrinoformación por recalcificación del plasma se procedió según se resume a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Ensayo de fibrinoformación por recalcificación*).

Se incorporó una solución de dermatán sulfato a una solución *pool* de plasma antes del agregado de cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la concentración final de DSA resultara 1, 2, 4, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración final de DSB resultara 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. Se registró por quintuplicado la densidad óptica a 405 nm para el control y cada una de las concentraciones de dermatán sulfato ensayadas, a partir del agregado de cloruro de calcio.

En la figura 41 (escala completa y escala ampliada) se indican los resultados obtenidos, pudiendo observarse que el dermatán sulfato presentó efecto anticoagulante en todas las concentraciones ensayadas. En particular, en presencia de DSA 50 $\mu\text{g/ml}$ no se observó formación de coágulo. Puede observarse además, que las curvas correspondientes a dermatán sulfato presentaron un patrón de coagulación diferente al control, caracterizado por la presencia de una mayor fase de latencia, una menor velocidad de fibrinoformación,

un mayor tiempo de coagulación y una menor densidad óptica máxima, y que el efecto observado fue mayor para DSA que para DSB a la misma concentración ensayada.

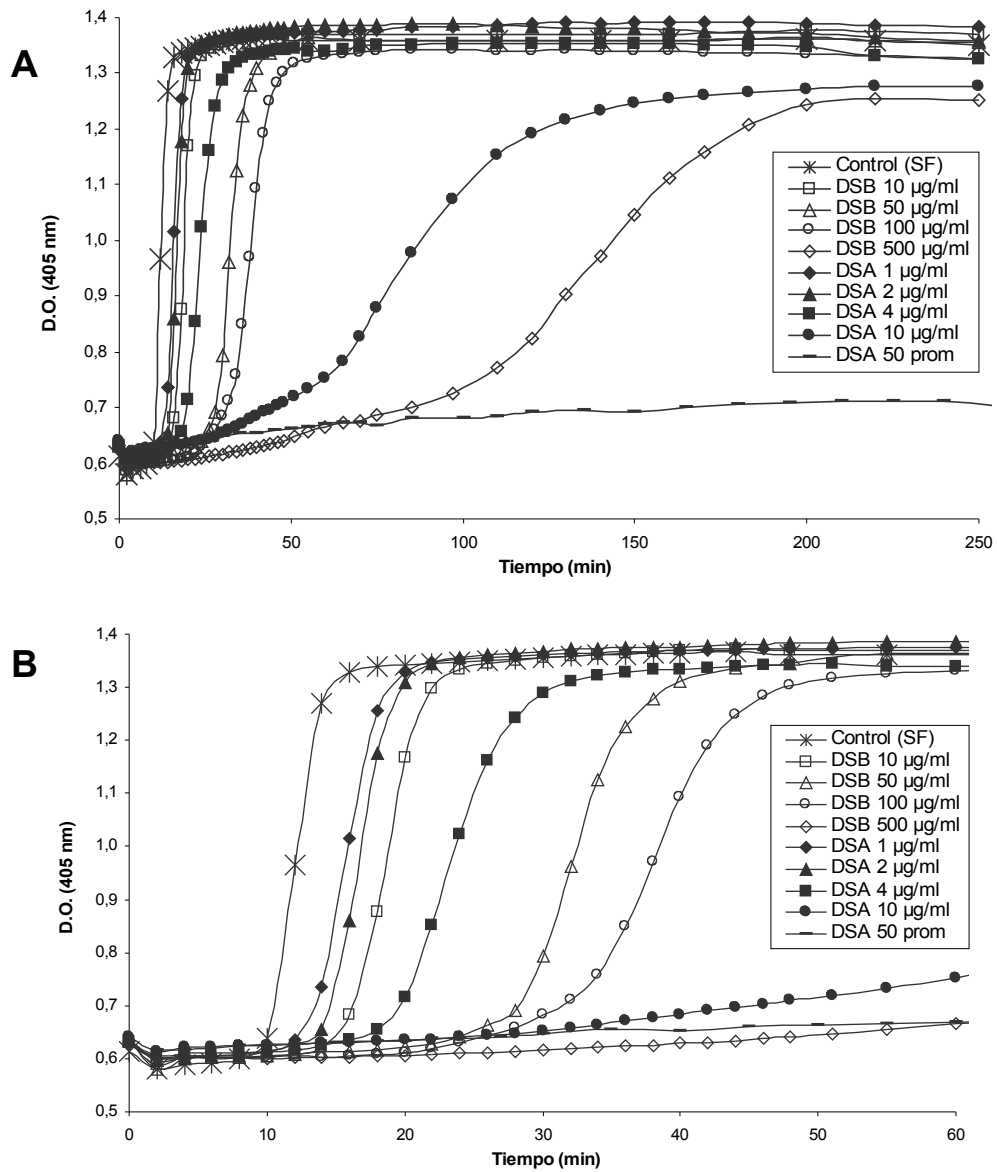


Figura 41: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por recalcificación. Escala completa y ampliada.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

A) Escala completa (0 a 250 minutos) y B) Escala ampliada (0 a 60 minutos).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Si bien en todos los casos (excepto DSA 50 µg/ml) por observación a simple vista se verificó la formación de coágulos homogéneos que ocuparon el volumen total del medio de

reacción, al analizar el aspecto de las curvas se diferencian dos tipos de comportamiento en función de la concentración de dermatán sulfato. En presencia de DSB 10, 50 y 100 µg/ml y DSA 1, 2 y 4 µg/ml (escala ampliada) el aspecto general de las curvas de fibrinoformación resultó semejante al control, mientras que se observaron diferencias mayores en presencia de DSB 500 µg/ml y DSA 10 µg/ml (escala completa).

En la tabla 10 se resumen los resultados obtenidos al caracterizar las curvas de fibrinoformación a partir de los parámetros “fase de latencia” (fase lag), “velocidad de fibrinoformación”, “tiempo de coagulación” y “densidad óptica máxima” (D.O. Máx.).

Tabla 10: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por recalcificación.

Concentración evaluada	Fase lag (min)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)	10 (9 - 10)	A	0,158 (0,150 - 0,165)	A B
DSB (µg/ml)	10	15 (14 - 16) *	0,177 (0,159 - 0,244)	A
	50	24 (24 - 26) *	0,088 (0,067 - 0,092) *	C
	100	26 (25 - 30) *	0,066 (0,054 - 0,076) *	C
	500	75 (60 - 97) *	0,0072 (0,0066 - 0,0090) *	D
DSA (µg/ml)	1	13 (12 - 14) *	0,145 (0,130 - 0,163)	B
	2	14 (13 - 14) *	0,159 (0,131 - 0,181)	B
	4	19 (17 - 21) *	0,085 (0,074 - 0,087) *	C
	10	36 (28 - 44) *	0,0085 (0,0080 - 0,0102) *	D
	50	No coaguló		No coaguló

Concentración evaluada	Tiempo de coagulación (min)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$	D.O. Máx.	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)	16 (16 - 18)	A	1,342 (1,337 - 1,349)	A B C
DSB (µg/ml)	10	25 (23 - 27) *	1,356 (1,350 - 1,362)	A B C
	50	46 (42 - 46) *	1,362 (1,355 - 1,374)	A B
	100	55 (51 - 55) *	1,336 (1,322 - 1,339)	C
	500	210 (183 - 210) *	1,253 (1,231 - 1,282) *	D
DSA (µg/ml)	1	21 (19 - 23) *	1,365 (1,358 - 1,372)	A B
	2	23 (21 - 23) *	1,374 (1,363 - 1,383)	A
	4	33 (33 - 36) *	1,335 (1,334 - 1,351)	C
	10	176 (145 - 176) *	1,265 (1,249 - 1,299) *	D
	50	No coaguló		No coaguló

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación por recalcificación, expresados como mediana y rango ($n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas de fibrinoformación en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

B.- FORMACIÓN DE FIBRINA POR AGREGADO DE TROMBINA

Se realizó una adaptación de la prueba “tiempo de trombina” con el objetivo de evaluar por espectrofotometría el proceso completo de fibrinoformación. Para caracterizar el efecto anticoagulante del DSA y DSB sobre la fibrinoformación por agregado de trombina se procedió según se resume a continuación (Ver detalle del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Ensayo de fibrinoformación por agregado de trombina*).

Se incorporó una solución de dermatán sulfato a una solución *pool* de plasma (sin diluir o diluido al 50 % en *buffer* PBS) antes del agregado de trombina y cloruro de calcio para formar el coágulo (concentración final: 0,05 U/ml y 33 mM respectivamente), de modo que la concentración final de DSA resultara 4, 10, 40 y 100 µg/ml y la concentración final de DSB resultara 10, 50, 100 y 500 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. Se registró por quintuplicado la densidad óptica a 405 nm para el control y cada una de las concentraciones de DS ensayadas, a partir del agregado de trombina y cloruro de calcio.

En las figuras 42 (plasma sin diluir) y 43 (plasma diluido) se presentan los resultados obtenidos, pudiendo observarse que las curvas correspondientes a dermatán sulfato presentaron un patrón de coagulación diferente al control, caracterizado por la presencia de una mayor fase de latencia, una menor velocidad de fibrinoformación, un mayor tiempo de coagulación y una menor densidad óptica máxima y que el efecto observado fue mayor para DSA que para DSB a la misma concentración ensayada. El patrón de coagulación observado en presencia de dermatán sulfato resultó similar al obtenido en los ensayos de recalcificación del plasma.

Las curvas obtenidas fueron caracterizadas a partir de los parámetros “fase lag”, “velocidad de fibrinoformación”, “tiempo de coagulación” y “D.O. Máx.” y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11 (plasma sin diluir) y 12 (plasma diluido).

Analizando la figura 42 con más detenimiento, puede observarse que el dermatán sulfato presentó efecto anticoagulante en todas las concentraciones ensayadas, no observándose formación de coágulo en presencia de DSA 100 µg/ml. Por observación a simple vista se verificó la formación de coágulos homogéneos que ocuparon el volumen total del medio de reacción en presencia de DSB 10, 50 y 100 µg/ml y DSA 4 y 10 µg/ml, mientras que en presencia de DSB 500 µg/ml y DSA 40 µg/ml el aspecto de los coágulos fue desaparejo.

Estas diferencias se corresponden con el aspecto de las curvas obtenidas, entre las que puede identificarse dos tipos de comportamiento en función de la concentración de dermatán sulfato.

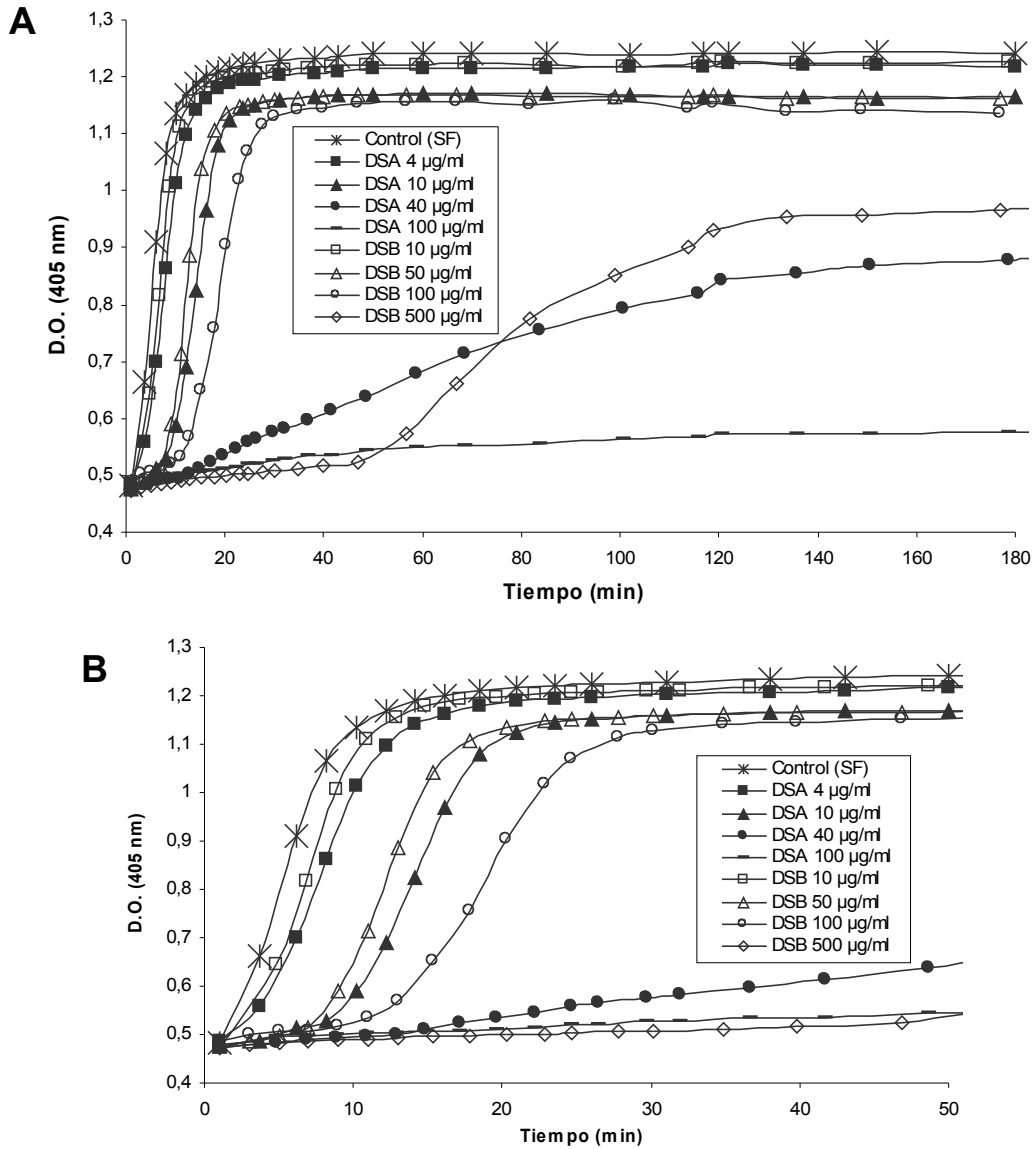


Figura 42: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por agregado de trombina. Plasma sin diluir.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

A) Escala completa (0 a 180 minutos) y B) escala ampliada (0 a 50 minutos).

En la tabla 11 se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes a la figura 42.

Tabla 11: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por agregado de trombina. Plasma sin diluir.

Concentración evaluada	Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)	0 (0 - 0)	0,091 (0,084 - 0,092)	A B
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	0,091 (0,083 - 0,101)	A
	50	0,074 (0,063 - 0,086) *	C
	100	0,047 (0,042 - 0,056) *	C
	500	0,011 (0,007 - 0,018) *	D
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	4	0,070 (0,064 - 0,078) *	B
	10	0,063 (0,059 - 0,068) *	B
	40	0,0039 (0,0020 - 0,0045) *	C
	100	No coaguló	No coaguló

Concentración evaluada	Tiempo de coagulación (min)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$	D.O. Máx.	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)	16,5 (16 - 18,5)	A	1,231 (1,181 - 1,241)	A
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	A	1,216 (1,196 - 1,235)	A
	50	A	1,167 (1,138 - 1,181) *	A
	100	A	1,153 (1,147 - 1,167) *	A
	500	B	1,038 (1,006 - 1,079) *	B
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	4	A	1,207 (1,206 - 1,216)	A
	10	A	1,170 (1,154 - 1,179) *	A
	40	C	0,878 (0,744 - 1,011) *	C
	100	No coaguló	No coaguló	No coaguló

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación por agregado de trombina a partir de plasma sin diluir, expresados como mediana y rango ($n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas de fibrinoformación en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test de Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

NOTA: No se realizó análisis de la varianza para el parámetro “fase lag” porque hay tres grupos donde la varianza resultó igual a cero.

En la figura 43 puede observarse que el dermatán sulfato presentó efecto anticoagulante en todas las concentraciones ensayadas. En particular, en presencia de DSA 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$ no se observó formación de coágulo.

Nuevamente se identificaron dos tipos de comportamiento en función de la concentración de dermatán sulfato. Por observación a simple vista se verificó la formación de coágulos homogéneos que ocuparon el volumen total del medio de reacción en presencia de DSB 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y DSA 4 y 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en presencia de DSB 500 $\mu\text{g/ml}$ el aspecto de los coágulos fue desaparejo.

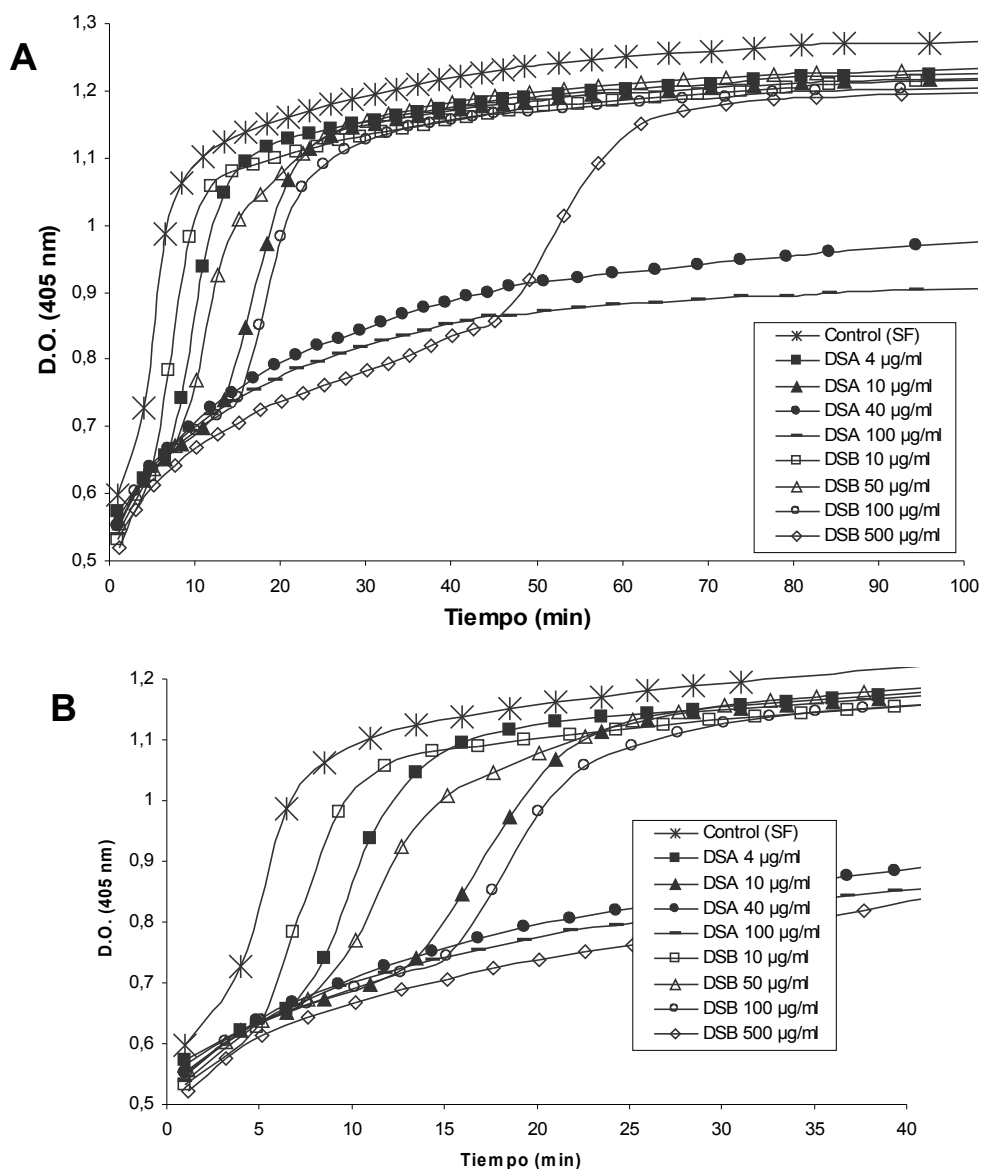


Figura 43: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por agregado de trombina. Plasma diluido.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

A) Escala completa (0 a 100 minutos) y B) escala ampliada (0 a 40 minutos).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

En la tabla 12 se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes a la figura 43.

Tabla 12: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la formación de fibrina por agregado de trombina. Plasma diluido.

Concentración evaluada	Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
Control (SF)	0 (0 - 0)	0,103 (0,094 - 0,118)	A
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	5 (5 - 5) *	0,079 (0,076 - 0,082) *
	50	7 (7 - 10) *	0,062 (0,048 - 0,076) *
	100	15 (15 - 15) *	0,048 (0,045 - 0,051) *
	500	45 (45 - 47) *	0,024 (0,017 - 0,028) *
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	4	6,5 (6,5 - 7) *	0,068 (0,061 - 0,081) *
	10	12 (11 - 15) *	0,055 (0,046 - 0,059) *
	40	No coaguló	No coaguló
	100	No coaguló	No coaguló

Concentración evaluada	Tiempo de coagulación (min)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$	D.O. Máx.	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
Control (SF)	11 (11 - 16)	A	1,272 (1,242 - 1,291)	A
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	14 (12 - 14)	1,213 (1,189 - 1,234) *	B
	50	17,5 (15 - 20) *	1,230 (1,198 - 1,267) *	B
	100	25 (25 - 27,5) *	1,202 (1,180 - 1,229) *	B
	500	67 (62 - 72) *	1,197 (1,175 - 1,215) *	B
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	4	19 (19 - 21) *	1,223 (1,211 - 1,230) *	B
	10	26 (23,5 - 28,5) *	1,214 (1,205 - 1,223) *	B
	40	No coaguló	No coaguló	
	100	No coaguló	No coaguló	

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación por agregado de trombina a partir de plasma diluido 50 % en *buffer* PBS, expresados como mediana y rango ($n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas de fibrinoformación en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

NOTA: No se realizó análisis de la varianza para el parámetro “fase lag” porque hay dos grupos donde la varianza resultó igual a cero.

Resumiendo, en los estudios *in vitro* de formación de fibrina por recalcificación del plasma y por agregado de trombina realizados, se evaluó por espectrofotometría el proceso de fibrinoformación, en particular las etapas de liberación de fibrinopéptidos y polimerización de los monómeros para formar el gel de fibrina.

En todas las concentraciones ensayadas el dermatán sulfato presentó efecto anticoagulante, siendo el efecto observado mayor en presencia de DSA que en presencia de DSB para la misma concentración estudiada.

La prueba de **recalcificación del plasma** depende principalmente de la capacidad de generación de trombina del plasma y por lo tanto, pueden observarse tiempos alargados en casos de déficit de factores o por la presencia de inhibidores de factores o de tipo anti-

trombina, mientras que la prueba de **fibrinoformación por agregado de trombina** depende principalmente de la calidad y cantidad de fibrinógeno presente en el plasma y de la presencia de anticoagulantes tipo anti-trombina.

En nuestro caso debido a que se trabajó a partir de un *pool* de plasma, la capacidad de generación de trombina y la calidad y cantidad de fibrinógeno resultaron constantes. Por lo tanto, se evaluó de manera directa el efecto anticoagulante del dermatán sulfato vía interacción con el cofactor II de la heparina presente en el plasma y se caracterizó el aspecto de las curvas de fibrinoformación obtenidas.

El efecto anticoagulante del dermatán sulfato sobre la formación de fibrina plasmática se caracterizó por aumento de la fase de latencia, disminución de la velocidad de fibrinoformación, prolongación del tiempo de coagulación y disminución de la densidad óptica máxima.

Teniendo en cuenta que los parámetros fase de latencia, velocidad de fibrinoformación y tiempo de coagulación caracterizan la cinética de fibrinoformación producto de la acción de trombina sobre el fibrinógeno, el efecto observado representaría la inhibición de la actividad de trombina debido a la interacción DS-CH II-trombina y la expresión del conocido efecto anticoagulante del dermatán sulfato.

Por otro lado, como la densidad óptica máxima está relacionada con la estructura tridimensional de la red formada, los resultados obtenidos estarían indicando la formación de una red de fibrina más abierta y transparente.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA ESTRUCTURA DE REDES DE FIBRINA

En los ensayos de fibrinoformación presentados en la sección previa, el efecto anticoagulante del dermatán sulfato se manifestó alterando el patrón de las curvas de coagulación, y se caracterizó por la prolongación de la fase de latencia y el tiempo de coagulación y por la disminución de la velocidad de fibrinoformación y la densidad óptica máxima a medida que aumentaba la concentración de dermatán sulfato presente en el sistema en estudio.

En presencia de dermatán sulfato, la acción de trombina sobre el fibrinógeno depende del equilibrio DS-CH II-trombina y por lo tanto el aumento de la fase de latencia, la disminución de la velocidad de fibrinoformación y el aumento del tiempo de coagulación representan la inhibición de la generación de fibrina debido a la acción potenciadora del dermatán sulfato de la capacidad inhibitoria del cofactor II de la heparina presente en el plasma sobre la trombina generada por recalcificación (estudios de recalcificación del plasma) o agregada externamente (estudios de fibrinoformación por agregado de trombina).

Respecto a la densidad óptica de la red formada en presencia de dermatán sulfato, la disminución observada sugiere cambios en la estructura de la fibrina asociados a una red más abierta y transparente. Teniendo en cuenta que la estructura de la red de fibrina tiene implicancias respecto de la acción del sistema fibrinolítico, se realizaron estudios de *compactación* y observación por *microscopía electrónica* con el objetivo de describir las características de la estructura de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular.

• COMPACTACIÓN DE REDES DE FIBRINA

La compactación es una característica que indica cuánto se colapsa un material por efecto de fuerzas externas. En este caso se utilizó fuerza centrífuga cuya magnitud está determinada por la velocidad y el tiempo de centrifugación. En particular, en el caso de geles de fibrina la compactación depende de la rigidez de la estructura de la red y del tamaño del compartimiento líquido limitado por esa estructura.

Para evaluar el efecto del DSA y DSB sobre la prueba de compactación de geles de fibrina se procedió según se resume a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de

análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Ensayo de compactación de redes de fibrina*.

Se incorporó una solución de dermatán sulfato antes del agregado de trombina bovina y cloruro de calcio (concentración final: 0,05 U/ml y 33 mM respectivamente) para formar un coágulo a partir de plasma diluido al 50 % en *buffer* PBS, de modo que la concentración final de DSA resultara 4, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración final de DSB resultara 10, 40, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. Los coágulos de fibrina fueron estabilizados a 37 °C durante 3 horas y posteriormente fueron centrifugados a 2.000 x g durante 2 minutos. Se determinó el peso de la solución exudada y del coágulo compactado.

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de compactación, calculado como la relación porcentual entre el peso del volumen exudado y el peso del total del gel de fibrina. Puede observarse que en presencia de dermatán sulfato aumentó la compactación de los geles de fibrina. El efecto observado fue mayor en presencia de DSA que de DSB para la misma concentración estudiada.

Además, puede observarse que en presencia de concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y de 100 $\mu\text{g/ml}$ de DSB, la estructura de los geles de fibrina resultó incapaz de soportar la fuerza centrífuga aplicada, compactándose totalmente.

Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos de fibrinoformación donde además de las diferencias observadas respecto de la cinética de fibrinoformación, en presencia de DSB 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y DSA 4 y 10 $\mu\text{g/ml}$ se comprobó la formación de coágulos homogéneos que ocuparon el volumen total del medio de reacción, mientras que en presencia de concentraciones mayores de dermatán sulfato el aspecto de los coágulos resultó desparejo. Si bien todos los geles de fibrina formados en presencia de dermatán sulfato presentaron mayor grado de compactación que los geles control, comparándolos entre sí, los coágulos que habían resultado homogéneos estarían asociados a una estructura más resistente a la fuerza centrífuga aplicada, mientras que los coágulos que habían resultado desparejos estarían asociados a una estructura frágil incapaz de soportar la fuerza centrífuga aplicada.

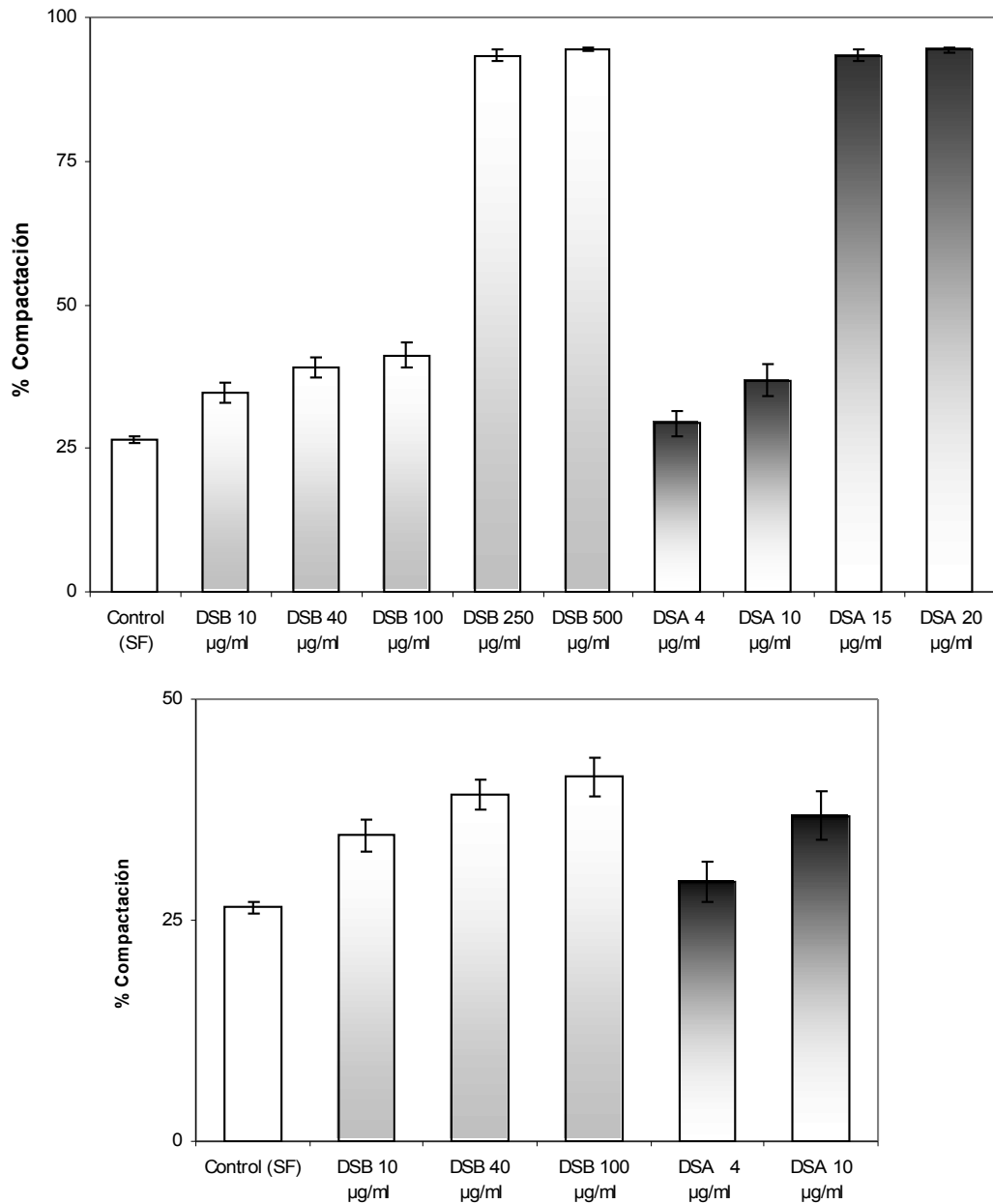


Figura 44: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la compactación de geles de fibrina.

Ensayo de compactación de geles de fibrina formados a partir de *pool* de plasma diluido al 50 % en *buffer* PBS por agregado de trombina bovina (conc. final 0,05 U/ml) y cloruro de calcio (conc. final 33 mM).

Se grafican los porcentajes de compactación promedio obtenidos para el control (solución fisiológica) y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (media \pm desvío estándar, $n = 3$).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular

En la tabla 13 se resumen los resultados obtenidos en el ensayo de compactación para cada concentración de dermatán sulfato ensayada.

Tabla 13: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la compactación de geles de fibrina.

Ensayo de compactación de geles de fibrina formados a partir de *pool* de plasma diluido al 50 % en *buffer* PBS por agregado de trombina bovina (conc. final 0,05 U/ml) y cloruro de calcio (conc. final 33 mM).

Se indican los porcentajes de compactación (% Compactación) expresados como media \pm desvío estándar ($n = 3$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para la comparación del porcentaje de compactación obtenido en presencia de DS respecto del control, se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Concentración evaluada		% Compactación	ANOVA <i>Test</i> de Tukey $\alpha = 0,05$
Control (SF)		24,4 \pm 0,6	A
DSB (μ g/ml)	10	34,7 \pm 1,8 *	B
	50	39,2 \pm 1,7 *	B C
	100	41,2 \pm 2,1 *	C
	250	93,3 \pm 1,0 *	D
	500	94,5 \pm 0,4 *	D
DSA (μ g/ml)	4	29,3 \pm 2,3 *	A
	10	36,8 \pm 2,7 *	B C
	15	93,4 \pm 1,1 *	D
	20	94,4 \pm 0,4 *	D

Resumiendo, se trabajó a partir de un *pool* de plasma, por agregado de una cantidad estandarizada de trombina y cloruro de calcio, y se evaluó la rigidez de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular mediante un ensayo de compactación.

Los resultados obtenidos indican que en presencia de dermatán sulfato se formaron geles de fibrina más fácilmente compactables. Estos geles de fibrina presentarían una estructura de red constituida por fibras más frágiles separadas por compartimientos líquidos más grandes.

• MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE REDES DE FIBRINA

Se determinó la estructura de redes de fibrina formadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular por microscopía electrónica de barrido (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Imágen de la red de fibrina por microscopía electrónica*).

Para ello, se obtuvieron redes de fibrina a partir de *pool* de plasma por agregado de trombina bovina (conc. final 0,8 U/ml) y cloruro de calcio (conc. final 33 mM) sobre soportes de vidrio, en presencia de DSA de modo que la concentración final resultara 4 μ g/

ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DSA por solución fisiológica.

Las redes de fibrina formadas se dejaron estabilizar en cámara húmeda durante 18 horas a 4 °C y luego fueron tratadas (fijación, deshidratación, secado por punto crítico, metalización) para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido, obteniendo las fotografías correspondientes a 3.000 aumentos.

En la figura 45 se muestran las imágenes de las redes de fibrina obtenidas en presencia de DSA y su respectivo control. Puede observarse que las redes obtenidas en presencia de DSA resultaron más abiertas con fibras más delgadas que las controles.

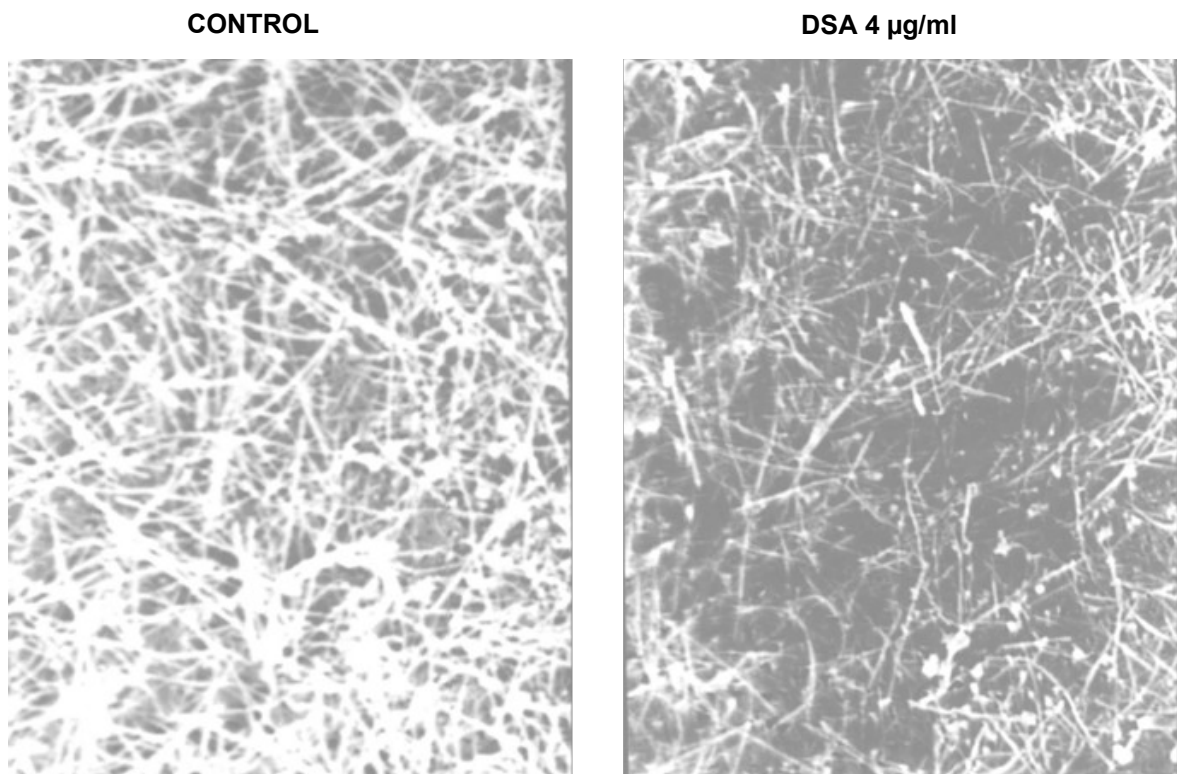


Figura 45: Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la estructura de redes de fibrina plasmática.

Observación por microscopía electrónica de barrido de redes de fibrina obtenidas a partir de *pool* de plasma por agregado de trombina bovina (conc. final 0,8 U/ml) y cloruro de calcio (conc. final 33 mM), en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular (DSA, 4 µg/ml) o solución fisiológica (control).

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en los ensayos de fibrinoformación donde la disminución observada de la densidad óptica de la red formada en presencia de

dermatán sulfato, sugirió cambios en la estructura de la fibrina asociados a una red más abierta y transparente.

En la tabla 14 se muestran los resultados de la caracterización de las redes, indicando que las redes formadas en presencia de DSA son más abiertas (menor % de red), formadas por igual número de fibras más largas y delgadas que las controles.

Tabla 14: Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la estructura de redes de fibrina plasmática: caracterización de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Caracterización por MEB de redes de fibrina	Control (SF)	DSA (4 µg/ml)	Análisis estadístico
% de Red ($n = 30$)	60 ± 5	31 ± 3	<i>Test de M-W</i> $p < 0,001$
N° de fib/campo ($n = 30$)	61 ± 3	57 ± 5	<i>Test de M-W</i> NS
Largo de fibras (µm; $n = 250$)	$59,5 \pm 1,7$	$75,0 \pm 1,1$	<i>Test de T</i> $p = 0,001$
Ancho de fibras (µm; $n = 250$)	$35,4 \pm 1,8$	$24,3 \pm 0,8$	<i>Test de T</i> $p < 0,001$

Se evaluaron 30 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red midiendo: el porcentaje de red (% Red, relación porcentual entre la superficie ocupadas por las fibras respecto al área total del campo), el número de fibras por campo (N° de fib/campo) el largo y ancho de las fibras.

Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de T o el *test* de *Mann-Whitney (M-W)* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resumiendo, se trabajó a partir de un *pool* de plasma, por agregado de una cantidad estandarizada de trombina y cloruro de calcio, y se evaluó la estructura tridimensional de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular mediante observación por microscopía electrónica.

La evaluación de las redes de fibrina por microscopía electrónica indica que las redes formadas en presencia de dermatán sulfato presentaron igual densidad de fibras, más largas y delgadas que las fibras control, resultando una arquitectura más abierta.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estas características, podría plantearse que las redes formadas en presencia de dermatán sulfato serían más susceptibles a la lisis.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE DE LA LISABILIDAD DE REDES DE FIBRINA

Se evaluó el efecto del dermatán sulfato *ex vivo* sobre la actividad fibrinolítica, evaluando la lisabilidad de redes de fibrina formadas a partir de plasma (*Ensayo de coagulación y fibrinólisis en dos etapas*), sangre entera (*Tiempo de lisis del coágulo sangre entera diluida*) y fracción de euglobulinas plasmática (*Tiempo de lisis de euglobulinas*).

En estos ensayos se evalúa el tiempo necesario hasta la disolución del coágulo, producto del balance entre la acción de los activadores e inhibidores fibrinolíticos y las características de la red a lizar. La diferencia fundamental es que en la prueba de lisis de redes plasmáticas y lisis de sangre entera se mantiene la proporción normal de los componentes del sistema de coagulación y fibrinolítico mientras que en la prueba de lisis de euglobulinas se precipita la fracción de euglobulinas del plasma y se separan los inhibidores del sistema fibrinolítico e inhibidores del sistema de coagulación. En particular, el ensayo de lisis de euglobulinas permite evaluar la activación fibrinolítica por método coagulométrico.

• ENSAYO DE COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS EN DOS ETAPAS

Para evaluar la lisis de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular se procedió según se resume a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Ensayo de coagulación y fibrinólisis en dos etapas*).

Se incorporó una solución de DSA a una solución *pool* de plasma antes del agregado de trombina y cloruro de calcio para formar el coágulo (concentración final: 0,05 U/ml y 33 mM respectivamente), de modo que la concentración final resultara 4, 10, 20, 40 y 100 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de DSA por solución fisiológica.

Se registró por quintuplicado la densidad óptica a 405 nm para el control y cada una de las concentraciones de DSA ensayadas. Se verificó la formación completa de las redes de fibrina por espectrofotometría y se dejaron estabilizar 18 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se agregó una solución de u-PA y se registró la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo hasta la disolución completa del coágulo.

En la figura 46 se presentan los resultados de la etapa de fibrinoformación, donde puede observarse que se manifestó claramente el efecto anticoagulante del dermatán sulfato caracterizado por aumento de la fase de latencia, disminución de la velocidad de fibrinoformación, prolongación del tiempo de coagulación y disminución de la densidad óptica máxima de la red de fibrina formada, proporcional al aumento de la concentración de DSA.

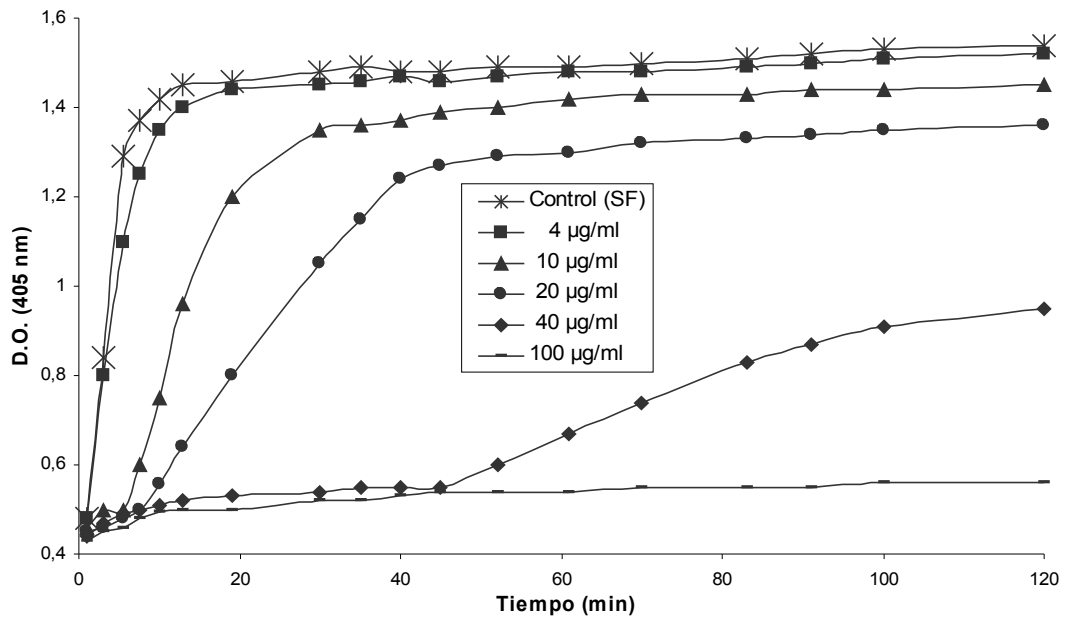


Figura 46: Prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas. Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la etapa de fibrinoformación.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$). SF = solución fisiológica.

En esta etapa se reprodujeron los efectos observados en los ensayos de fibrinoformación realizados previamente con DSA. En particular, no se observó formación de coágulo en presencia de 100 µg/ml de DSA.

En la tabla 15 se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes a cada concentración de DSA ensayada.

Tabla 15: Prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas. Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la etapa de fibrinoformación.

Concentración evaluada	Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	Tiempo de coagulación (min)	D.O. Máx.
Control (SF)	ausencia	0,180 (0,170 - 0,185)	13 (11 - 14)	1,54 (1,50 - 1,56)
DSA (µg/ml)	4	ausencia	19 (18,5 - 21) *	1,52 (1,48 - 1,53) *
	10	5,5 (4,5 - 7) *	30 (28 - 31) *	1,45 (1,45 - 1,50) *
	20	7,5 (7 - 10) *	45 (40 - 45) *	1,36 (1,31 - 1,37) *
	40	45 (39 - 47) *	120 (112 - 131) *	0,95 (0,94 - 0,98) *
	100	No coaguló		

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes a la prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas, expresados como mediana y rango ($n = 5$). SF = solución fisiológica, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Para comparar los parámetros de las curvas de fibrinoformación en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Las redes formadas en presencia de DSA fueron estabilizadas a temperatura ambiente y se evaluó el tiempo de lisis a partir del agregado de u-PA.

En este ensayo el comportamiento del sistema lítico depende no solo del efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de los componentes involucrados (Plg + u-PA), sino también de la estructura de la red de fibrina ya que una red más abierta y con fibras más delgadas será más fácilmente lisible que una red cerrada y con fibras más gruesas. Además, si bien no evaluamos la permeabilidad de la red formada en presencia de DSA, se debe considerar este factor como otro condicionante de la acción del sistema lítico.

En la figura 47 puede observarse que las redes formadas en presencia de DSA fueron lisadas más rápidamente que la red control. En particular el efecto se destaca para las concentraciones de DSA 10, 20 y 40 µg/ml, mientras que el efecto en presencia de 4 µg/ml de DSA no fue significativo.

Las curvas de lisis fueron caracterizadas a partir de la determinación del tiempo de lisis final, y los resultados se resumen en la tabla 16.

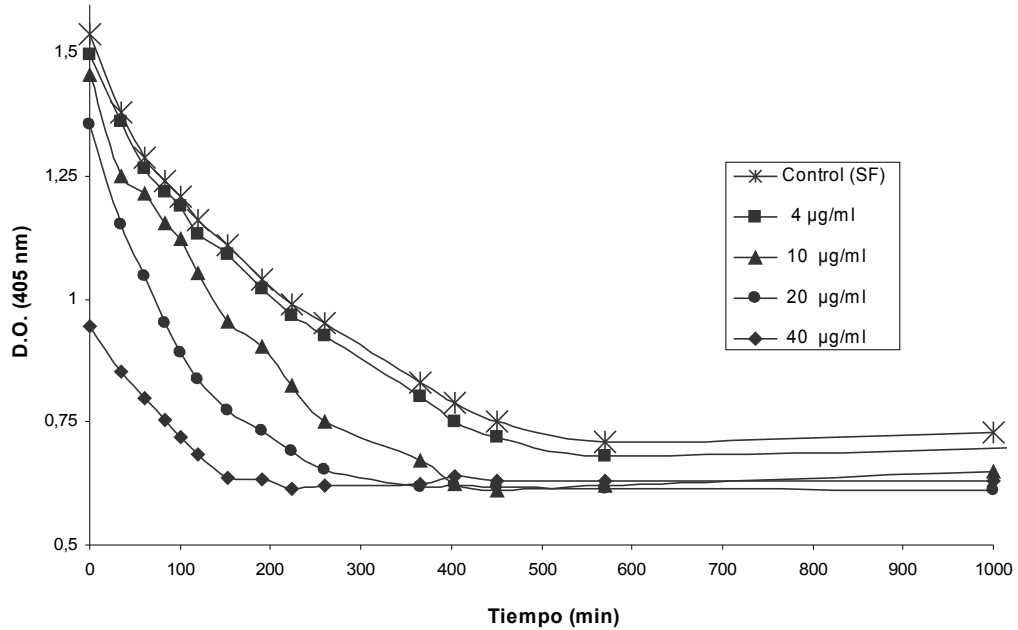


Figura 47: Prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas. Lisis de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas durante la lisis de las redes formadas en presencia de solución fisiológica (control) y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$). SF = solución fisiológica.

Tabla 16: Prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas. Lisis de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular.

Se resumen los tiempos de lisis promedio para las redes formadas en presencia de solución fisiológica (control) y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas, expresados como mediana (rango), $n = 5$.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los tiempos de lisis en presencia de dermatán sulfato respecto del control, se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

NS = no significativo, SF = solución fisiológica, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Concentración evaluada	Tiempo de lisis (minutos)	ANOVA <i>Test</i> de Tukey $\alpha = 0,05$	<i>Test</i> de <i>Mann-Whitney</i>
Control (SF)	564 (540 - 570)	A	
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	4	A	NS
	10	B	$p = 0,014$
	20	C	$p = 0,014$
	40	D	$p = 0,014$

Resumiendo, se formaron redes de fibrina plasmática en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular y se evaluó su lisabilidad por agregado de u-PA, observando que resultaban más rápidamente lisadas que la red de fibrina control.

Teniendo en cuenta, que en ensayos previos se había demostrado que las redes formadas en presencia de dermatán sulfato presentaron una arquitectura más abierta, constituida por igual número de fibras, más largas y delgadas, se había postulado que serían más susceptibles a la lisis. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis planteada. Éste sería otro mecanismo a través del cual el dermatán sulfato tendría efecto profibrinolítico.

• TIEMPO DE LISIS DEL COÁGULO DE SANGRE ENTERA DILUIDA

Para evaluar el efecto del DSA y DSB sobre la lisabilidad de un coágulo formado a partir de sangre entera diluida, se obtuvo sangre venosa de cinco individuos voluntarios sanos siguiendo las recomendaciones para las pruebas de fibrinólisis y se procedió con cada muestra según se resume a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida*).

Se incorporó una solución de dermatán sulfato a la sangre entera diluida antes del agregado de trombina para formar el coágulo, de modo que la concentración final de dermatán sulfato resultara 0,2, 1, 2, 5, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. El ensayo fue realizado dentro de los 20 minutos de la obtención de la muestra y se determinó, por duplicado, el tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida para el control ($\text{LSE}_{\text{control}}$) y cada una de las concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (LSE_{DS}).

En la figura 48 y la tabla 17 se indican los resultados de un ensayo individual, donde puede observarse que el tiempo de lisis disminuyó en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato y que el efecto observado fue mayor en presencia de DSA que de DSB para la misma concentración estudiada.

Debido a que no se observó formación del coágulo en presencia de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSB, no se evaluó el tiempo de lisis en esos tubos.

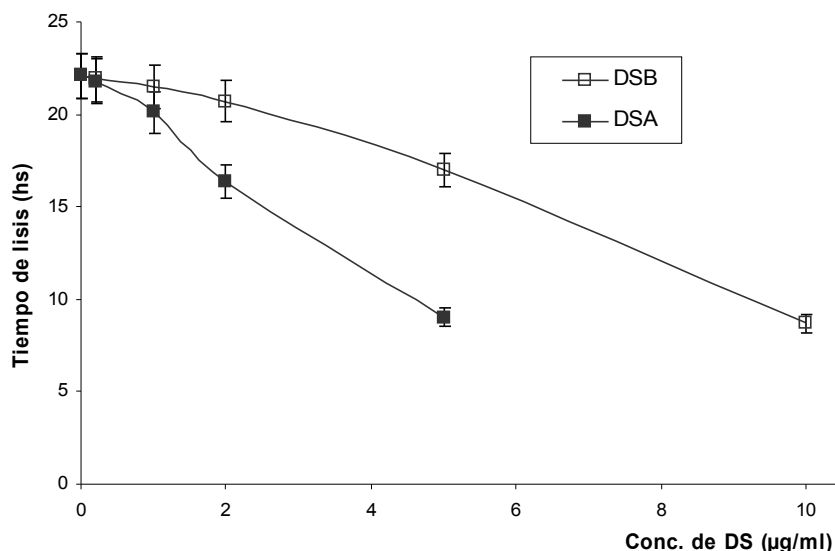


Figura 48: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis del coágulo de sangre entera diluida.

Se indican tiempos de lisis (horas) en función de la concentración de dermatán sulfato utilizado ($\mu\text{g/ml}$) para un ensayo individual realizado por triplicado (media \pm desvío estándar).

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Tabla 17: Tiempos de lisis del coágulo de sangre entera diluida en presencia de dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular.

Se indican los resultados para el ensayo individual realizado por triplicado correspondiente a la Figura 46. El tiempo de lisis correspondiente a cada concentración estudiada se indica como media \pm desvío estándar ($n = 3$).

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Concentración evaluada		Tiempo de lisis (LSE) (horas)
Control		22,1 \pm 1,2
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	0,2	21,9 \pm 2,7
	1	21,5 \pm 0,7
	2	20,7 \pm 0,6
	5	17,0 \pm 1,1
	10	8,7 \pm 0,5
	50	No coaguló
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	0,2	21,4 \pm 1,1
	1	20,1 \pm 1,1
	2	16,4 \pm 1,0
	5	9,0 \pm 0,5
	10	No coaguló
	50	No coaguló

Cada ensayo completo fue realizado en cinco oportunidades, utilizando sangre de un individuo sano cada vez. Del mismo modo que en el ensayo individual presentado previamente, en ninguno de los 5 casos se observó formación completa del coágulo en presencia de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSB, por lo tanto no se evaluó el tiempo de lisis en esos tubos. También en todas las oportunidades se observó un

acortamiento del tiempo de lisis en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato, cuya magnitud fue mayor en presencia de DSA que de DSB para la misma concentración estudiada.

Los resultados finales se presentan como las diferencias entre los tiempos obtenidos con cada control y los obtenidos en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas y están resumidos en la tabla 18.

Tabla 18: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre la prueba de lisis del coágulo de sangre entera diluida.

Se resumen las diferencias promedio entre los tiempos obtenidos con cada control y los obtenidos en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas ($LSE_{control} - LSE_{DS}$) presentadas como mediana (rango), $n = 5$. Para el análisis estadístico se aplicó el *test* de *Wilcoxon* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular, NS = no significativo.

Concentración evaluada		Diferencia $LSE_{control} - LSE_{DS}$ (horas)	Test de <i>Wilcoxon</i>
DSB ($\mu\text{g/ml}$)	0,2	0,2 (0 - 0,5)	NS
	1	0,6 (0 - 0,9)	NS
	2	0,7 (0 - 0,9)	NS
	5	6,6 (5,1 - 8,0)	$p = 0,0312$
	10	13,9 (15,5 - 12,4)	$p = 0,0312$
DSA ($\mu\text{g/ml}$)	0,2	0,3 (0 - 0,5)	NS
	1	2 (0,9 - 2,5)	$p = 0,0312$
	2	8,8 (5,7 - 11,8)	$p = 0,0312$
	5	14,3 (13,1 - 15,5)	$p = 0,0312$

Resumiendo, se observó una disminución del tiempo de lisis en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato y el efecto observado fue mayor en presencia de DSA que DSB para la misma concentración estudiada. En ninguno de los casos se observó formación completa del coágulo en presencia de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSB, poniéndose claramente de manifiesto el efecto anticoagulante del dermatán sulfato en este ensayo.

El tiempo de lisis del coágulo formado a partir de la sangre diluida depende principalmente de los niveles de fibrinógeno, factor XIII, plasminógeno y del equilibrio entre los activadores e inhibidores del sistema fibrinolítico. Por lo tanto, si los niveles de fibrinógeno, factor XIII y plasminógeno son normales y constantes, el tiempo de lisis depender fundamentalmente del equilibrio entre t-PA y PAI-1, ya que al diluir la sangre se minimiza el efecto del principal inhibidor de la plasmina (α_2 -antiplasmina).

Por otro lado, el tiempo de lisis puede resultar alterado, independientemente de una alteración fibrinolítica, cuando la capacidad de formación de fibrina está afectada (hipofibrinogenemia u otras alteraciones de fibrinoformación).

En particular, debido a que en esta prueba están presentes todos los componentes plasmáticos, la interacción DS-CH II puede modificar la actividad de la trombina agregada. Por lo tanto, aunque sólo se evaluó tiempo de lisis en aquellos tubos en los que se pudo verificar coagulación completa, no puede descartarse que la estructura del coágulo formado en presencia de dermatán sulfato sea diferente en el resto de los tubos.

En el ensayo de lisis del coágulo de sangre entera diluida con agregado de dermatán sulfato ex vivo se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato. Si bien los resultados obtenidos pueden deberse a un efecto neto sobre la activación del sistema fibrinolítico no puede descartarse que el efecto observado sea una consecuencia del efecto anticoagulante del dermatán sulfato, considerando los cambios observados en la estructura de la fibrina formada en presencia de dermatán sulfato en ensayos previos.

• TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS

Se evaluó el efecto del DSA y DSB sobre la lisabilidad de un coágulo formado a partir de una solución de euglobulinas (*A: lisis de euglobulinas estándar*).

En una segunda etapa se evaluó la lisabilidad de un coágulo formado a partir de en una fracción de euglobulinas precipitada en presencia de dermatán sulfato (*B: lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato*).

A.- EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE EL TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS ESTÁNDAR

Para evaluar el efecto del DSA y DSB sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar, se obtuvo sangre venosa de cinco individuos voluntarios sanos siguiendo las recomendaciones para las pruebas de fibrinólisis, se separó el plasma y se obtuvo el precipitado de euglobulinas siguiendo las indicaciones descriptas en la técnica original. A partir de los precipitados obtenidos se preparó un *pool* de euglobulinas y se procedió según se resume a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Tiempo de lisis de euglobulinas*).

Se incorporó una solución de dermatán sulfato a la solución *pool* de euglobulinas antes del agregado de cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la concentración final de dermatán sulfato resultara 10 y 100 µg/ml. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. Se determinó, por quintuplicado, el tiempo de lisis de euglobulinas para el control (LE_{control}) y cada una de las concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (LE_{DS}).

En la tabla 19 se indican los resultados obtenidos y puede observarse que en presencia de DSB no se observaron diferencias respecto del control a ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que el tiempo de lisis de euglobulinas disminuyó significativamente en presencia de 100 µg/ml de DSA.

Tabla 19: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar: método de tiempo final.

Se resumen los tiempos de lisis promedio para el control y los obtenidos en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (media ± desvío estándar; *n* = 5). Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas. Para comparar los tiempos de lisis en presencia de DS respecto del control, se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un *p* valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. NS = no significativo, SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Concentración evaluada		Tiempo de lisis (LE) (minutos)	ANOVA <i>Test</i> de <i>Tukey</i> $\alpha = 0,05$	<i>Test</i> de <i>Mann-Whitney</i>
Control (SF)		203 ± 23	A	
DSB (µg/ml)	10	188 ± 8	A B	<i>p</i> = 0,111 (NS)
	100	206 ± 19	A	<i>p</i> = 0,369 (NS)
DSA (µg/ml)	10	190 ± 18	A B	<i>p</i> = 0,2817 (NS)
	100	165 ± 9	B	<i>p</i> = 0,004

En una segunda etapa se realizó una adaptación de la prueba de euglobulinas para evaluar las etapas de fibrinoformación y lisis por espectrofotometría. El objetivo fue aumentar la sensibilidad para distinguir diferencias en el patrón de lisis y poder determinar si el dermatán sulfato presenta en este ensayo algún efecto sobre la fibrinoformación que pueda confundir la interpretación de los resultados de los tiempos de lisis.

Se procedió de manera similar al ensayo anterior (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Tiempo de lisis de euglobulinas*; trabajando en policubetas de poliestireno).

Se incorporó una solución de dermatán sulfato a la solución *pool* de euglobulinas antes del agregado de cloruro de calcio para formar el coágulo, de modo que la concentración final

de dermatán sulfato resultara 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de dermatán sulfato por solución fisiológica. A partir del agregado de cloruro de calcio, se registró por quintuplicado la densidad óptica a 405 nm para el control y cada una de las concentraciones de dermatán sulfato ensayadas.

En la figura 49 se presentan los resultados del registro espectrofotométrico durante el ensayo completo de lisis de euglobulinas, pudiendo diferenciarse una primera etapa de fibrinoformación, una etapa intermedia donde el coágulo se mantiene estable y una última etapa correspondiente a la lisis de euglobulinas propiamente dicha.

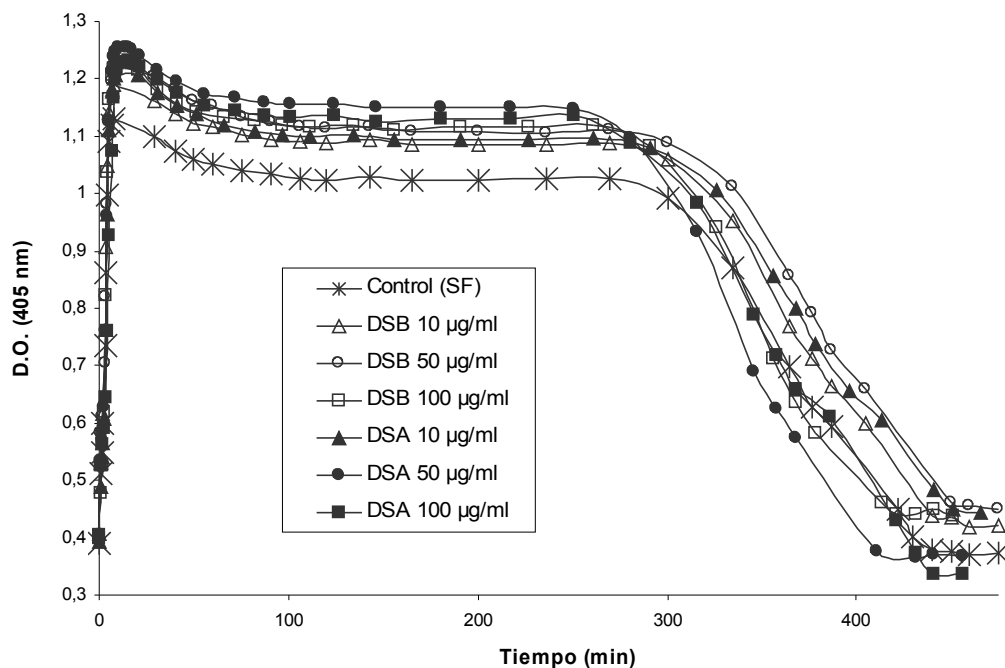


Figura 49: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar: método espectrofotométrico.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Para analizar los resultados se evaluó por separado la etapa de fibrinoformación (hasta los 20 minutos del ensayo) y la etapa de lisis (a partir de los 250 minutos de ensayo).

Respecto de la fibrinoformación, en la figura 50 puede observarse que la curva correspondiente a DSA 100 $\mu\text{g/ml}$ presenta un patrón de coagulación diferente al control, caracterizado por la presencia de una leve fase de latencia, menor velocidad de

fibrinoformación y mayor tiempo de coagulación. Este patrón de coagulación (tabla 20) corresponde con el efecto anticoagulante del dermatán sulfato descrito en los ensayos de *fibrinoformación por recalcificación o por agregado de trombina*, por lo tanto esta concentración no fue considerada en el análisis de la etapa de lisis.

Sin embargo cabe destacar, que el efecto anticoagulante observado fue de menor magnitud ya que en los ensayos mencionados, el agregado de DSA 100 $\mu\text{g/ml}$ inhibió completamente la coagulación mientras que en el presente ensayo el efecto fue mínimo.

Por otro lado, puede observarse que el resto de las curvas correspondientes a dermatán sulfato fueron similares a la curva control. No se observó aumento de la fase de latencia ni del tiempo de coagulación, ni disminución de la velocidad de fibrinoformación ni de la densidad óptica final (tabla 20). Por lo tanto, el dermatán sulfato en las condiciones empleadas en este ensayo (a excepción de DSA 100 $\mu\text{g/ml}$) no presentaría un efecto anticoagulante significativo.

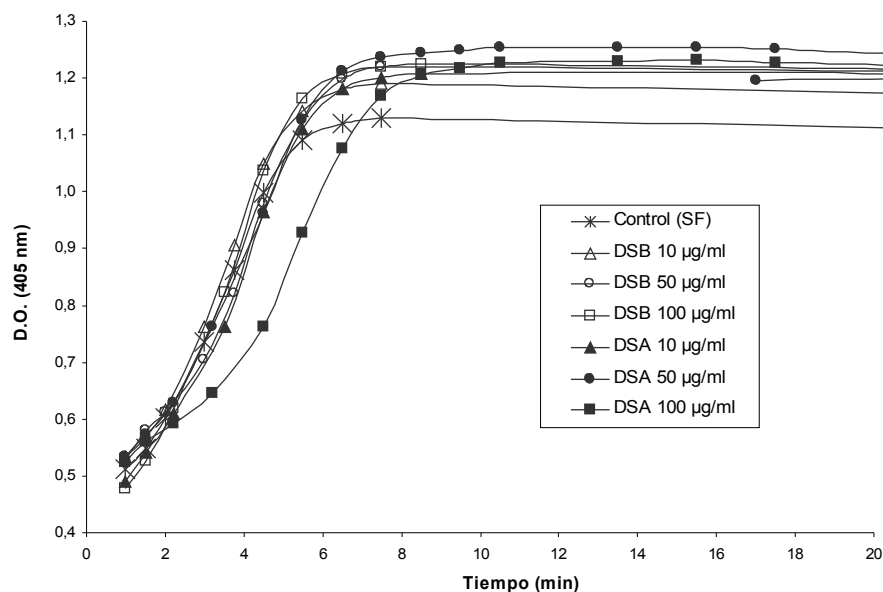


Figura 50: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar. Método espectrofotométrico: etapa de fibrinoformación.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Tabla 20: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar. Método espectrofotométrico: parámetros correspondientes a la etapa de fibrinoformación.

Concentración evaluada		Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)		ausencia	0,159 (0,144 - 0,176)	B C
DSB (µg/ml)	10	ausencia	0,173 (0,154 - 0,195)	A B
	50	ausencia	0,147 (0,145 - 0,158)	C D
	100	ausencia	0,186 (0,179 - 0,190)	A
DSA (µg/ml)	10	ausencia	0,155 (0,141 - 0,157)	C
	50	ausencia	0,145 (0,145 - 0,148)	D
	100	2 (2-2) *	0,130 (0,129 - 0,135) *	D

Concentración evaluada		Tiempo de coagulación (min)	D.O. Máx.	ANOVA <i>Test de Tukey</i> $\alpha = 0,05$
Control (SF)		7 (7 - 7)	1,129 (1,061 - 1,161)	A
DSB (µg/ml)	10	7 (6 - 7)	1,191 (1,152 - 1,250)	A B
	50	7 (7 - 7)	1,205 (1,195 - 1,214)	B
	100	7 (7 - 7)	1,224 (1,216 - 1,237)	B
DSA (µg/ml)	10	8 (7 - 8)	1,208 (1,186 - 1,236)	B
	50	8 (7 - 8)	1,255 (1,243 - 1,263)	B
	100	10 (10 - 10) *	1,231 (1,206 - 1,250)	B

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes a la prueba de lisis de euglobulinas modificada, expresados como mediana (rango), $n = 5$.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para la comparación de los parámetros de las curvas en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test de Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

NOTA: No se realizó análisis de la varianza para el parámetro “fase lag” y “tiempo de coagulación” porque hay grupos donde la varianza resultó igual a cero.

Respecto de la etapa de lisis, puede observarse que las curvas correspondientes a los ensayos en presencia de DSB 10 y 50 µg/ml y DSA 10 µg/ml son paralelas a la curva control, mientras que el patrón de lisis en presencia de DSB 100 µg/ml y DSA 50 µg/ml es diferente (figura 51).

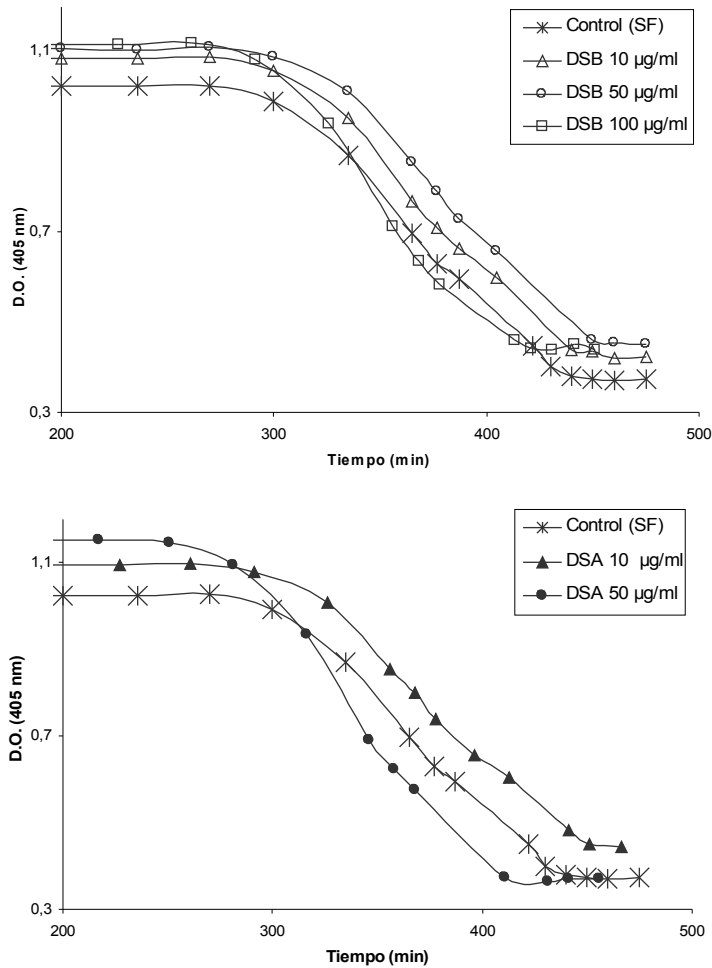


Figura 51: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar. Método espectrofotométrico: datos originales de la etapa de lisis.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Se realizó una transformación de los datos, corrigiendo el tiempo de lisis por el tiempo de coagulación determinado en la etapa de fibrinoformación (Tiempo - T. coagulación) y calculando los descensos de la densidad óptica a partir de la densidad óptica máxima correspondiente al inicio de la lisis ($D.O. \text{ Max. lisis} - D.O.$), para cada concentración evaluada. Para caracterizar el patrón de lisis de euglobulinas se determinó la “velocidad de lisis” y el “tiempo de lisis” sobre las curvas sigmoideas obtenidas (figura 52).

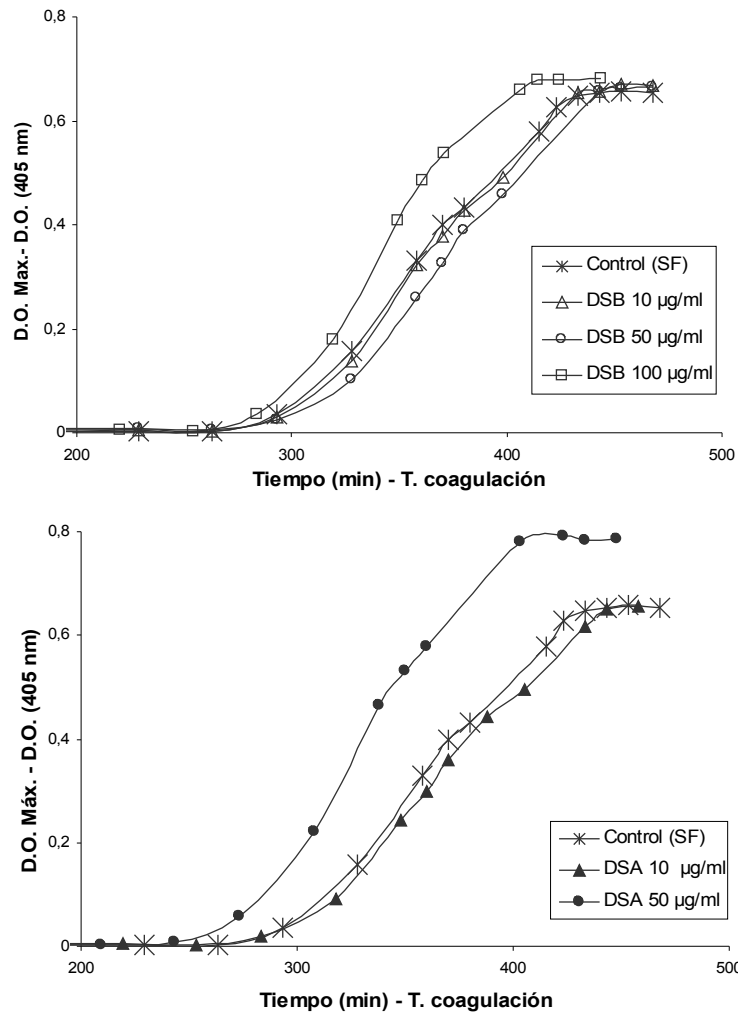


Figura 52: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar. Método espectrofotométrico: datos transformados de la etapa de lisis.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para el control y en presencia de las diferentes concentraciones de dermatán sulfato ensayadas (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$). SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

En la tabla 21 se indican los resultados obtenidos, pudiendo observarse que en presencia de DSB 100 µg/ml y DSA 50 µg/ml aumentó la velocidad de lisis y consecuentemente disminuyó el tiempo asociado a la disolución del coágulo.

Tabla 21: Efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular *ex vivo* sobre el tiempo de lisis de euglobulinas estándar. Método espectrofotométrico: parámetros correspondientes a la etapa de lisis:

Concentración evaluada	Tiempo de lisis (TLE; min)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$	Velocidad de lisis (VLE; min ⁻¹)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
Control (SF)	433 (427 – 443)	A	0,0048 (0,0043 – 0,0053)	A
DSB (µg/ml)	10	A	0,0050 (0,0046 – 0,0056)	A
	50	A	0,0051 (0,0048 – 0,0054)	A
	100	B	0,0058 (0,0056 – 0,0059) *	B
DSA (µg/ml)	10	A	0,0046 (0,0044 – 0,0049)	A
	50	B	0,0060 (0,0059 – 0,0061) *	B

Se resumen los parámetros que describen las curvas de lisis correspondientes a la prueba de lisis se euglobulinas modificada, expresados como mediana y rango ($n = 5$).

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas de lisis en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test* de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

SF = solución fisiológica, DSB = dermatán sulfato de bajo peso molecular, DSA = dermatán sulfato de alto peso molecular.

Resumiendo, se preparó un *pool* de euglobulinas estándar y se evaluó el tiempo de lisis en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato. Por el método de tiempo final, se observó una disminución significativa del tiempo de lisis sólo en presencia de 100 µg/ml de DSA, mientras que no hubo efecto en presencia de DSB.

En la prueba de lisis de euglobulinas se evalúa fundamentalmente la activación de la fibrinólisis ya que la dilución y acidificación del plasma produce la precipitación de la fracción proteica de euglobulinas (que contiene principalmente fibrinógeno, plasminógeno y los activadores del plasminógeno) y se eliminan los inhibidores del sistema fibrinolítico (PAI-1 y α_2 -antiplasmina).

Por lo tanto, considerando que no se detectó efecto anticoagulante del dermatán sulfato puede inferirse que el efecto pro-fibrinolítico observado se debería a un efecto neto sobre la activación del sistema fibrinolítico y no a una consecuencia del conocido efecto anticoagulante.

Para confirmar este resultado, se realizó una adaptación de la prueba de euglobulinas para estudiar por espectrofotometría de manera independiente las etapas de fibrinoformación y lisis. En este ensayo se aumentó la sensibilidad para detectar diferencias en el patrón de fibrinoformación observando que, excepto en presencia de DSA 100 µg/ml, no hubo diferencias significativas respecto del control para ninguna de las concentraciones de dermatán sulfato ensayadas. Por lo tanto, se pudo descartar la presencia de un efecto anticoagulante que pueda confundir la interpretación de los resultados.

Debido al seguimiento continuo por espectrofotometría también se aumentó la sensibilidad para detectar diferencias en el patrón de lisis, pudiendo identificar que en presencia de DSA 50 µg/ml y DSB 100 µg/ml aumentó la velocidad de lisis y disminuyó el tiempo asociado a la disolución del coágulo.

En el ensayo de lisis de euglobulinas realizado se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis en presencia de dermatán sulfato. Debido a que se realizó una adaptación de la técnica original para evaluar la etapa de fibrinoformación por espectrofotometría, pudo descartarse el efecto anticoagulante del dermatán sulfato y por lo tanto concluir que el efecto pro-fibrinolítico observado se debería a un efecto neto sobre la activación del sistema fibrinolítico.

Particularmente, teniendo en cuenta que el principal activador de plasminógeno vascular es el t-PA, el efecto pro-fibrinolítico observado podría asociarse a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA. Este resultado se corresponde con los resultados obtenidos por método amidolítico.

B.- LISIS DE EUGLOBULINAS PRECIPITADAS EN PRESENCIA DE DERMATÁN SULFATO

Para evaluar el efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la precipitación y el tiempo de lisis de euglobulinas, se obtuvo sangre venosa de diez individuos voluntarios sanos, se preparó un *pool* de plasma normal y se procedió según se describe a continuación (Ver detalles del procedimiento y método de análisis de los resultados en la sección *Materiales y Métodos: Tiempo de lisis de euglobulinas*).

Se agregó una solución de DS a un *pool* de plasma de modo que la concentración final de DSA resultara 10, 25 y 50 µg/ml y la concentración final de DSB resultara 10, 50, 100 y 250 µg/ml y se incubó a 37 °C durante una hora. Se obtuvo el control correspondiente reemplazando la solución de DS por solución fisiológica.

Se precipitó la fracción de euglobulinas del plasma como fue descrito en la técnica original y a partir de los precipitados obtenidos se preparó un *pool* de euglobulinas-control y un *pool* de euglobulinas-DS para cada concentración ensayada.

El ensayo se realizó en policubetas de poliestireno, agregando 100 µl de *pool* de euglobulinas y 100 µl de solución de cloruro de calcio 0,025 M. Se registró la densidad

óptica a 405 nm en función del tiempo. Cada ensayo completo fue realizado por quintuplicado.

Durante la precipitación de euglobulinas se observó que el precipitado obtenido en presencia de dermatán sulfato era mayor que el obtenido en condiciones estándar. En particular el aumento observado resultó proporcional a la concentración de dermatán sulfato y aún mayor en presencia de DSA que de DSB, para la misma concentración estudiada. Se prepararon las diferentes fracciones de euglobulinas resuspendiendo los precipitados obtenidos en igual volumen de *buffer* borato y se realizaron los ensayos espectrofotométricos. A continuación se presentan por separado los resultados para DSB y DSA.

En la figura 53 se presentan los resultados del ensayo completo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB.

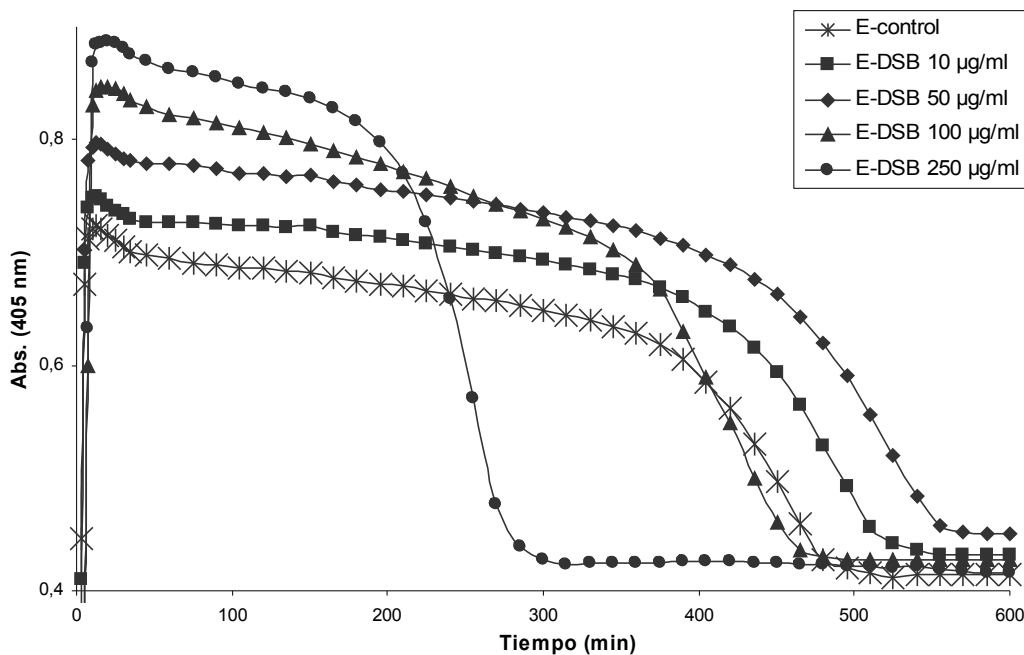
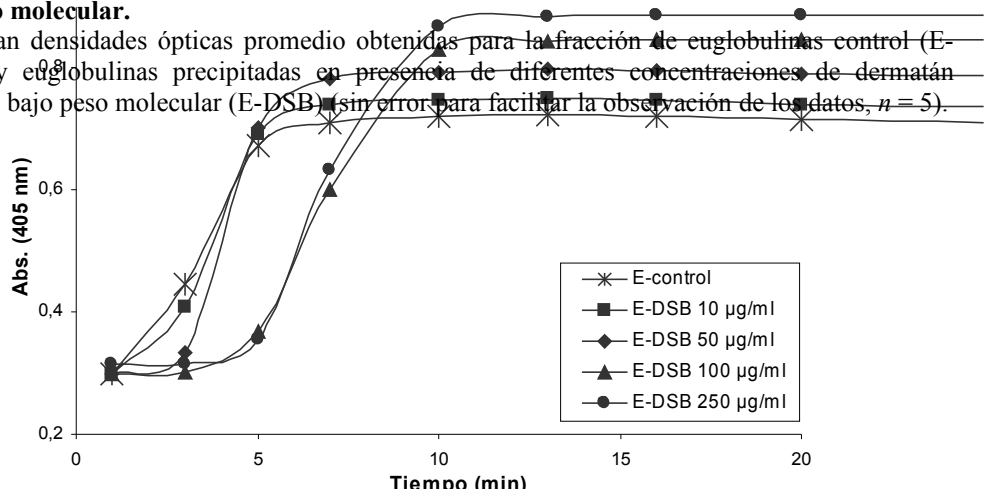


Figura 53: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de bajo peso molecular.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (E-DSB) sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$.



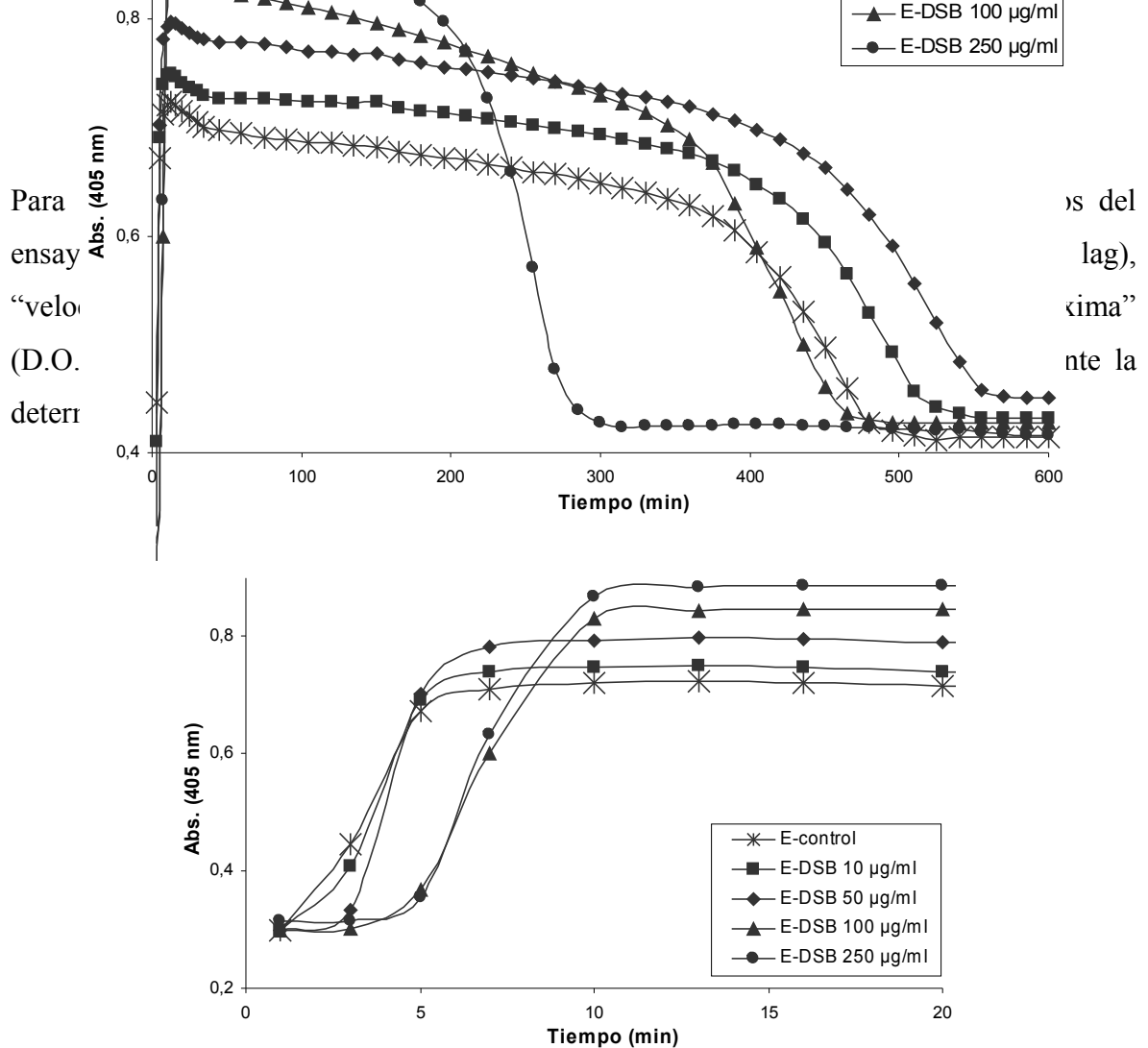


Figura 54: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de bajo peso molecular. Etapa de fibrinoformación (escala ampliada).

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (E-DSB) (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

Al analizar la etapa de fibrinoformación (figura 54) puede observarse que el patrón de coagulación no corresponde totalmente al patrón característico del efecto anticoagulante del dermatán sulfato, determinado durante los ensayos de *fibrinoformación por recalcificación o por agregado de trombina*. Si bien aumentó la fase de latencia y se prolongó el tiempo de coagulación, características del efecto anticoagulante, se observó un aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica máxima, indicando que la red formada sería más densa y cerrada, efecto contrario al observado cuando se manifiesta el poder anticoagulante del dermatán sulfato (tabla 22). Una explicación posible de estos resultados sería un aumento de la precipitación de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB, lo que coincidiría con la observación inicial de que el precipitado de euglobulinas obtenido en presencia de dermatán sulfato era mayor que el obtenido en condiciones estándar.

Teniendo en cuenta que el patrón de coagulación obtenido durante el análisis de la etapa de fibrinoformación correspondió sólo parcialmente al efecto anticoagulante del dermatán sulfato, todas las curvas fueron consideradas para el análisis de la etapa de lisis.

Tabla 22: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de bajo peso molecular: parámetros correspondientes a la etapa de fibrinoformación.

Etapa de fibrinoformación		Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		2 (1 - 2)	0,113 (0,112 - 0,114)	A
E-DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	2 (1 - 2)	0,142 (0,141 - 0,143) *	C
	50	3 (3 - 3) *	0,185 (0,180 - 0,190) *	D
	100	4 (3 - 4) *	0,123 (0,120 - 0,131) *	B
	250	4 (4 - 4) *	0,140 (0,139 - 0,150) *	C

Etapa de fibrinoformación		Tiempo de coagulación (min)	D.O. Máx	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		7 (7 - 7)	0,717 (0,696 - 0,735)	A
E-DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	7 (7 - 7)	0,741 (0,735 - 0,749) *	B
	50	7 (7 - 7)	0,792 (0,777 - 0,816) *	C
	100	11 (11 - 11) *	0,847 (0,840 - 0,853) *	D
	250	11 (11 - 11) *	0,887 (0,884 - 0,891) *	E

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes al ensayo de lisis de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (E-DSB). Los datos se expresan como mediana (rango), $n = 5$.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el test de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

NOTA: No se realizó análisis de la varianza para el parámetro “fase lag” y “tiempo de coagulación” porque hay grupos donde la varianza resultó igual a cero.

En la etapa de lisis puede observarse que las curvas en presencia de DSB 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ fueron paralelas a la curva control, mientras que las correspondientes a los precipitados obtenidos en presencia de DSB 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ fueron marcadamente diferentes, caracterizadas por una mayor velocidad de lisis y consecuentemente menor tiempo de lisis final (tabla 23). Este resultado sugiere que el DSB tendría acción pro-fibrinolítica.

Tabla 23: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de bajo peso molecular: parámetros correspondientes a la etapa de lisis.

Etapa de lisis		Tiempo de lisis (min)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$	Velocidad de lisis (min^{-1})	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		500 (480 - 510)	A	- 0,0023 (- 0,0022 a - 0,0024)	A
E-DSB ($\mu\text{g/ml}$)	10	525 (510 - 570)	B	- 0,0024 (- 0,0023 a - 0,0025)	A
	50	555 (555 - 570)	C	- 0,0023 (- 0,0022 a - 0,0024)	A
	100	480 (460 - 480) *	D	- 0,0028 (- 0,0027 a - 0,0029) *	B
	250	315 (300 - 315) *	E	- 0,0056 (- 0,0055 a - 0,0063) *	C

Se resumen los parámetros que describen las curvas de lisis correspondientes al ensayo de lisis de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo peso molecular (E-DSB). Los datos se expresan como mediana (rango), $n = 5$. Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas. Para comparar los parámetros de las curvas en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el test de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Sin embargo, para poder confirmar la interpretación de los resultados como un efecto profibrinolítico neto independiente del efecto anticoagulante, fue necesario demostrar no sólo el aumento de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB, sino también la ausencia de precipitación asociada de algún inhibidor natural como antitrombina o cofactor II de la heparina.

Se determinó la concentración proteica total en todas las soluciones de euglobulinas obtenidas y además, la concentración de fibrinógeno (Fbg) por método inmunológico, la concentración de plasminógeno (Plg), antitrombina III (AT III) y cofactor II de la heparina (CH II) por método amidolítico y los niveles de productos de degradación de fibrina o fibrinógeno (PDF) y dímero D (D-D) por método de aglutinación de latex.

Se observó que la concentración de proteínas totales aumentó en función del aumento de la concentración de DSB presente en la precipitación de euglobulinas. Además, conjuntamente con el aumento de proteínas totales, aumentaron los niveles de fibrinógeno y de plasminógeno (tabla 24).

Es importante señalar que los niveles de PDF y dímero D medidos a tiempo final de lisis aumentaron de forma proporcional al aumento de fibrinógeno en los precipitados.

Respecto de la búsqueda de inhibidores naturales de trombina, en el *pool* de plasma utilizado para precipitar la fracción de euglobulinas el nivel de AT III resultó $97,6 \% \pm 8,1$ y el nivel de CH II fue $131,5 \% \pm 2,6$ (media \pm desvío estándar, $n = 2$). No se detectó AT III ni CH II en ninguna de las soluciones de euglobulinas-DSB ensayadas.

Tabla 24: Efecto del dermatán sulfato de bajo peso molecular *ex vivo* sobre la precipitación de euglobulinas. Contenido (%) de las proteínas evaluadas en la fracción de euglobulinas precipitadas respecto del contenido presente en el plasma.

Se resumen los resultados de las determinaciones de concentración proteica total, fibrinógeno y plasminógeno, expresadas como porcentaje respecto del *pool* de plasma utilizado para precipitar las distintas fracciones de euglobulinas. Plasma = contenido de las proteínas evaluadas en el *pool* de plasma (el valor indicado

Concentración de DS	Proteínas totales (%)	Fibrinógeno (%)	Plasminógeno (%)
Plasma	62,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ $\pm 5,1$	100 %	98,3 % $\pm 4,1$
E-control	11,5 $\pm 1,1$	30	48,4 $\pm 3,4$
E-DSB ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10	12,6 $\pm 2,1$	30
	50	13,2 $\pm 0,9$	50
	100	14,6 $\pm 1,3$	60
	250	18,8 $\pm 2,2$	80

se consideró como 100 % para el cálculo del % de cada proteína en las fracciones de euglobulinas).

E-control = euglobulinas precipitadas en presencia de solución fisiológica. E-DSB = euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de bajo (DSB) peso molecular.

Resumiendo, se precipitó la fracción de euglobulinas en presencia de diferentes concentraciones de DSB y se evaluó el tiempo de lisis por espectrofotometría.

En la etapa de fibrinoformación se observó aumento de la fase de latencia, de la velocidad de fibrinoformación, del tiempo de coagulación y de la densidad óptica máxima. Estas características coinciden sólo parcialmente con el efecto anticoagulante del dermatán sulfato caracterizado previamente en ensayos de fibrinoformación, por lo tanto todas las curvas fueron consideradas para el análisis de la etapa de lisis.

En particular, los resultados obtenidos indicarían que las redes formadas a partir de las fracciones de euglobulinas-DSB serían más densas y cerradas que las redes formadas a partir de la fracción de euglobulinas-control.

Además, se confirmó la presencia de mayores niveles de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB, lo que explicaría la observación de un aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica final. No se detectaron niveles de AT III y CH II en ninguna de las fracciones de euglobulinas analizadas.

Respecto de la etapa de lisis, se observó una disminución significativa del tiempo de lisis en presencia de 100 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DSB. Paralelamente se observó un aumento de los niveles de PDF y dímero D. Además, se confirmó la presencia de mayores niveles de plasminógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB.

Teniendo en cuenta que se descartó la presencia de AT III y CH II en las fracciones de euglobulinas-DSB, que las redes de fibrina formadas a partir de estas fracciones serían más densas y cerradas (principalmente debido al aumento de los niveles de fibrinógeno)

y que se observó una disminución del tiempo de lisis final de euglobulinas, se puede concluir que el tendría acción pro-fibrinolítica independiente del efecto anticoagulante. En particular, el efecto pro-fibrinolítico podría asociarse al aumento de los niveles de plasminógeno determinados y/o a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA.

Por otro lado, aunque de manera indirecta, se podría descartar que el dermatán sulfato afecte el entrecruzamiento de la red mediado por factor XIIIa, ya que se observaron niveles de PDF y dímero D semejantes y proporcionales al aumento de fibrinógeno.

En la figura 55 se presentan los resultados del ensayo completo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de DSA.

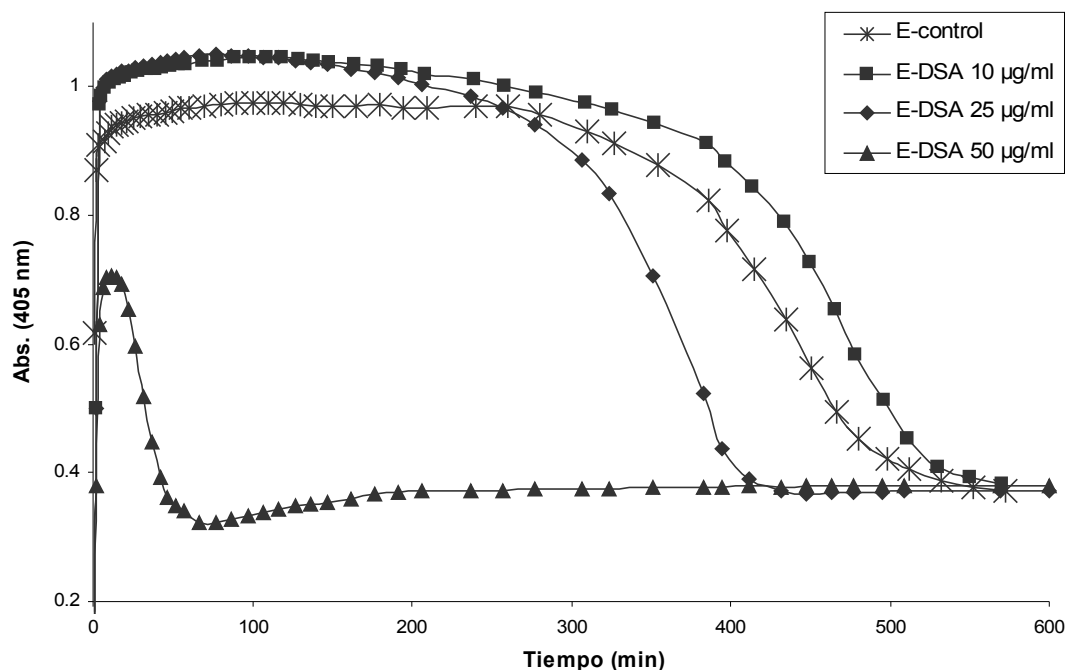
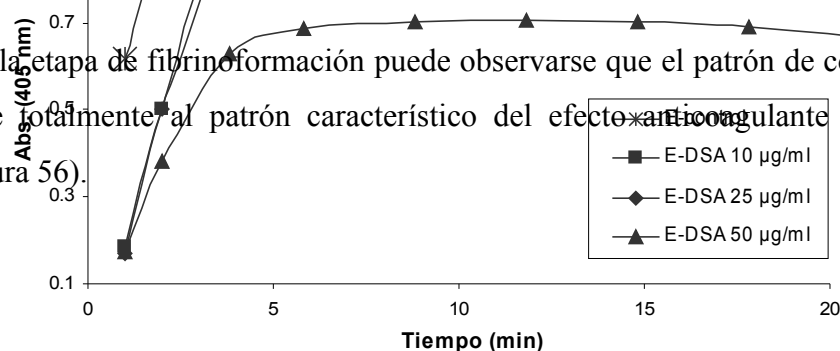


Figura 55: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular.

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA) (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

Al analizar la etapa de fibrinoformación puede observarse que el patrón de coagulación no corresponde totalmente al patrón característico del efecto anticoagulante del dermatán sulfato (figura 56).



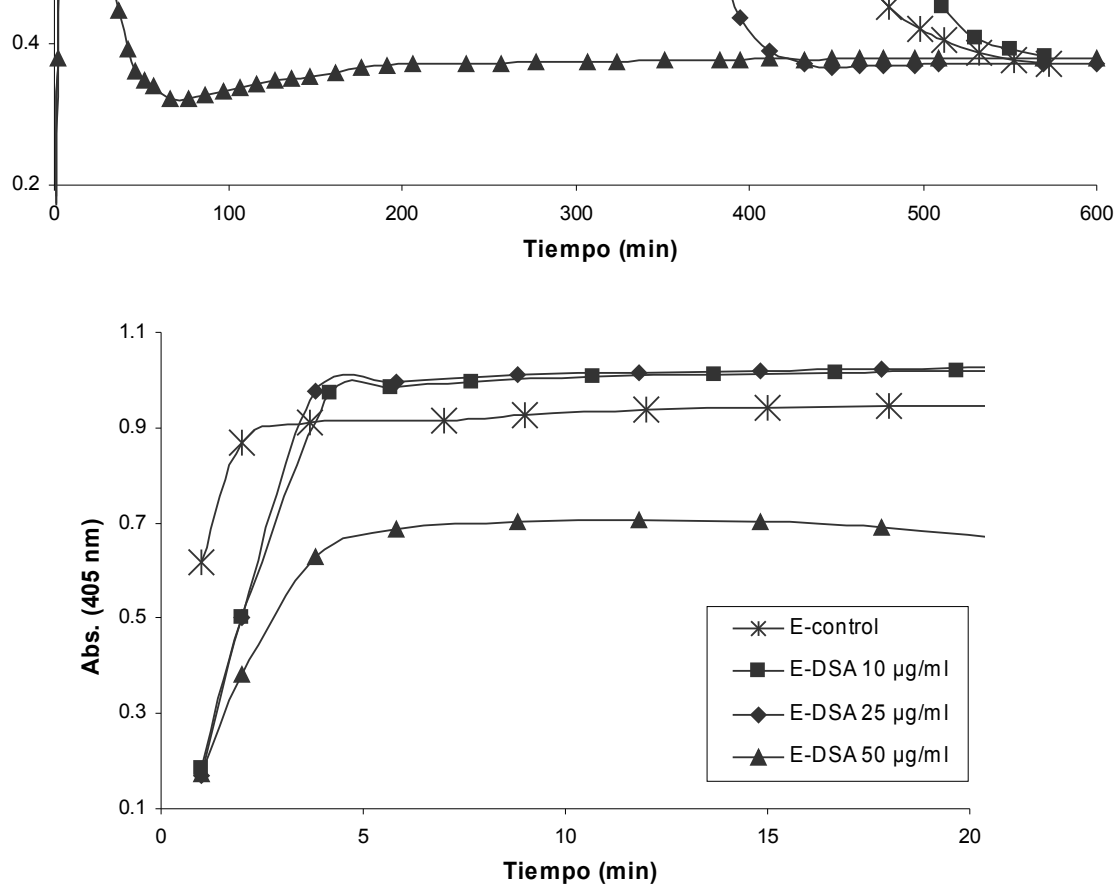


Figura 56: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular. Etapa de fibrinoformación (escala ampliada).

Se grafican densidades ópticas promedio obtenidas para la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA) (sin error para facilitar la observación de los datos, $n = 5$).

A = escala completa. B = escala ampliada (hasta 20 min).

La curva correspondiente a 50 µg/ml presentó características que concuerdan con el efecto anticoagulante del dermatán sulfato, por lo tanto se descartó para el análisis de la etapa de lisis de euglobulinas.

Por otro lado, en las curvas correspondientes a euglobulinas precipitadas en presencia de DSA 10 y 25 µg/ml, si bien se observó un mínimo aumento de la fase de latencia y se prolongó el tiempo de coagulación, características del efecto anticoagulante, también se observó un aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica máxima, indicando un efecto contrario al anticoagulante (tabla 25). Una explicación posible de estos resultados sería un aumento de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSA lo que coincidiría con la observación inicial de que el precipitado de euglobulinas obtenido en presencia de dermatán sulfato fue mayor que el obtenido en condiciones estándar.

Teniendo en cuenta que el patrón de coagulación obtenido durante el análisis de la etapa de fibrinoformación para las concentraciones de 10 y 25 µg/ml de DSA correspondió sólo

parcialmente al efecto anticoagulante del dermatán sulfato, ambas curvas fueron consideradas para el análisis de la etapa de lisis.

Tabla 25: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular: parámetros correspondientes a la etapa de fibrinoformación.

Etapa de fibrinoformación		Fase lag (min)	Velocidad de fibrinoformación (min ⁻¹)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		ausencia	0,252 (0,240 - 0,261)	A
E-DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	1 (1 - 1) *	0,248 (0,236 - 0,257)	A
	25	1 (1 - 1) *	0,285 (0,281 - 0,288)	B
	50	1 (1 - 1) *	0,161 (0,160 - 0,164) *	C

Etapa de fibrinoformación		Tiempo de coagulación (min)	D.O. Máx.	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		3 (3 - 3)	0,947 (0,940 - 0,952)	A
E-DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	4 (4 - 4) *	1,017 (1,003 - 1,041)	B
	25	4 (4 - 4) *	1,024 (1,022 - 1,029)	B
	50	5 (5 - 5) *	0,702 (0,994 - 0,716) *	C

Se resumen los parámetros que describen las curvas de fibrinoformación correspondientes al ensayo de lisis de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA). Los datos se expresan como mediana (rango), $n = 5$.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para comparar los parámetros de las curvas en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el *test de Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

NOTA: No se realizó análisis de la varianza para el parámetro “fase lag” y “tiempo de coagulación” porque hay grupos donde la varianza resultó igual a cero.

Al analizar las curvas de lisis se observó que los coágulos formados a partir de las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSA, resultaron lisados más rápidamente (tabla 26), indicando que también el DSA tendría efecto pro-fibrinolítico.

Sin embargo, para poder confirmar la interpretación de los resultados como un efecto pro-fibrinolítico independiente del efecto anticoagulante, fue necesario demostrar el aumento de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas-DSA, la ausencia de precipitación asociada de algún inhibidor natural como AT III o CH II y la relación entre los niveles de fibrinógeno, PDF y dímero D a tiempo final de lisis.

Tabla 26: Ensayo de lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato de alto peso molecular: parámetros correspondientes a la etapa lisis.

Etapa de lisis		Tiempo de lisis (min)	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$	Velocidad de lisis (min^{-1})	ANOVA Test de Tukey $\alpha = 0,05$
E-control		540 (530 - 550)	A	- 0,0043 (- 0,0041 a - 0,0046)	A
E-DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	550 (530 - 570)	A	- 0,0045 (- 0,0043 a - 0,0047)	A B
	25	430 (411 - 430) *	B	- 0,0053 (- 0,0050 a - 0,0058) *	B

Se resumen los parámetros que describen las curvas de lisis correspondientes al ensayo de lisis se euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA). Los datos se expresan como mediana (rango), $n = 5$. Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) se indican con letras mayúsculas. Los datos que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas. Para comparar los parámetros de las curvas en presencia de dermatán sulfato respecto del control se utilizó el test de *Mann-Whitney* y un p valor $< 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (*).

Se observó que la concentración de proteínas totales aumentó en función del aumento de la concentración de DSA presente en la precipitación de euglobulinas. Además, conjuntamente con el aumento de proteínas totales, aumentaron los niveles de fibrinógeno determinados por método inmunológico y de plasminógeno (tabla 27).

Es importante señalar que los niveles de PDF y dímero D medidos a tiempo final de lisis aumentaron de forma proporcional al aumento de fibrinógeno en los precipitados y que no se detectó AT III ni CH II en ninguna de las soluciones de euglobulinas-DSA ensayadas.

Tabla 27: Efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular *ex vivo* sobre la precipitación de euglobulinas. Contenido (%) de las proteínas evaluadas en la fracción de euglobulinas precipitadas respecto del contenido presente en el plasma.

Se resumen los resultados de las determinaciones de concentración proteica total, fibrinógeno y plasminógeno, expresadas como porcentaje respecto del *pool* de plasma utilizado para precipitar las distintas fracciones de euglobulinas. Plasma = contenido de las proteínas evaluadas en el *pool* de plasma (el valor indicado se consideró como 100 % para el cálculo del % de cada proteína en las fracciones de euglobulinas).

E-control = euglobulinas precipitadas en presencia de solución fisiológica. E-DSA = euglobulinas precipitadas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato de alto (DSA) peso molecular.

Concentración de DS		Proteínas totales (%)	Fibrinógeno (%)	Plasminógeno (%)
Plasma		62,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ $\pm 5,1$	100 %	98,3 % $\pm 4,1$
E-control		11,5 $\pm 1,1$	30	48,4 $\pm 3,4$
E-DSA ($\mu\text{g/ml}$)	10	13,4 $\pm 2,0$	40	62,1 $\pm 0,6$
	25	14,4 $\pm 1,5$	60	73,3 $\pm 1,8$

Resumiendo, se precipitó la fracción de euglobulinas en presencia de diferentes concentraciones de DSA y se evaluó el tiempo de lisis por espectrofotometría.

En la etapa de fibrinoformación se observó un aumento de la fase de latencia, del tiempo de coagulación, de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica máxima para las concentraciones de DSA 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Estas características coinciden sólo parcialmente con el efecto anticoagulante del dermatán sulfato caracterizado previamente en ensayos de fibrinoformación, por lo tanto ambas curvas fueron consideradas para el análisis de la etapa de lisis. En particular, los resultados obtenidos indicarían que las redes formadas a partir de las fracciones de euglobulinas-DSA serían más densas y cerradas que las redes formadas a partir de fracción de euglobulinas-control.

Por otro lado, la curva correspondiente a 50 $\mu\text{g/ml}$ presentó características que corresponderían a un efecto anticoagulante, por lo tanto se excluyó del análisis final.

Se confirmó la presencia de mayores niveles de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSA, lo que explicaría la observación de un aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica final. No se detectaron niveles de AT III y CH II en ninguna de las fracciones de euglobulinas analizadas.

Respecto de la etapa de lisis, se observó una disminución significativa del tiempo de lisis en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de DSA. Paralelamente se observó un aumento de los niveles de PDF y dímero D. Además, se confirmó la presencia de mayores niveles de plasminógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSA.

Teniendo en cuenta que se descartó la presencia de AT III y CH II en las fracciones de euglobulinas-DSA, que las redes de fibrina formadas a partir de estas fracciones serían más densas y cerradas (principalmente debido al aumento de los niveles de fibrinógeno) y que se observó una disminución del tiempo de lisis final de euglobulinas, se puede concluir que el DSA tendría acción pro-fibrinolítica independiente del efecto anticoagulante.

En particular, el efecto pro-fibrinolítico podría asociarse al aumento de los niveles de plasminógeno determinados y/o a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA.

Por otro lado, aunque de manera indirecta, se podría descartar que el dermatán sulfato afecte el entrecruzamiento de la red por factor XIIIa, ya que se observaron niveles de PDF y dímero D semejantes y proporcionales al aumento de fibrinógeno.

Para completar el análisis de la precipitación de euglobulinas en presencia de dermatán sulfato, se determinó el patrón electroforético por SDS-PAGE para las fracciones de

euglobulinas control y las obtenidas en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y 250 $\mu\text{g/ml}$ de DSB.

En la figura 57 puede observarse que el perfil electroforético de las tres fracciones de euglobulinas evaluadas es similar, aunque la intensidad de las bandas es ligeramente mayor para la fracción de euglobulinas DSA. Estos resultados coinciden con los presentados previamente, con referencia al aumento de la concentración de proteínas totales en las fracciones de euglobulinas-dermatán sulfato.

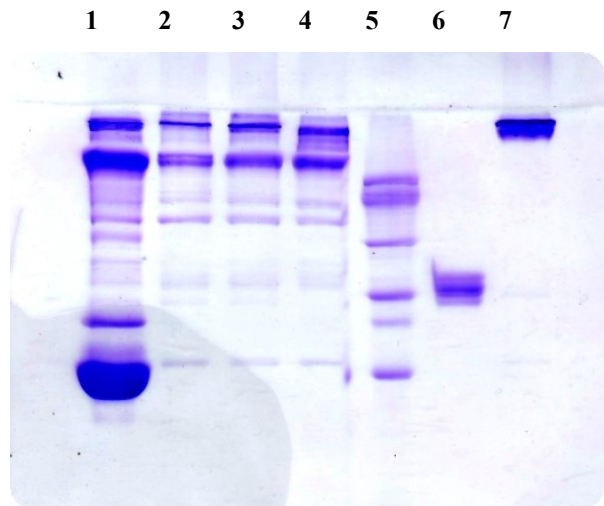
Figura 57: Caracterización de fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia dermatán sulfato por electroforesis SDS-PAGE. Comparación con la fracción de euglobulinas estándar.

T del gel concentrador 4 %, T del separador 8 %.

Perfil electroforético de la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de 250 $\mu\text{g/ml}$ de dermatán sulfato de bajo (E-DSB) o 50 $\mu\text{g/ml}$ de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA). Se sembró igual volumen de las tres fracciones en estudio.

Calles:

- 1 - Plasma.
- 2 - E - control.
- 3 - E - DSB 250 $\mu\text{g/ml}$.
- 4 - E - DSA 50 $\mu\text{g/ml}$.
- 5 - Marcadores de peso molecular (212, 170, 116, 76 y 53 kDa)
- 6 - Plasminógeno estándar.
- 7 - Fibrinógeno estándar.



Por otro lado, en la figura 58 se presenta el patrón electroforético para las fracciones de euglobulinas control y las obtenidas en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de DSA y 250 $\mu\text{g/ml}$ de DSB tratadas con 2-ME.

Puede notarse que el aumento de intensidad de bandas observado principalmente para la fracción de euglobulinas DSA se encuentra asociado a las bandas correspondientes al fibrinógeno. Este resultado coincide con los datos presentados previamente, con referencia

al aumento de la concentración de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas-dermatán sulfato.

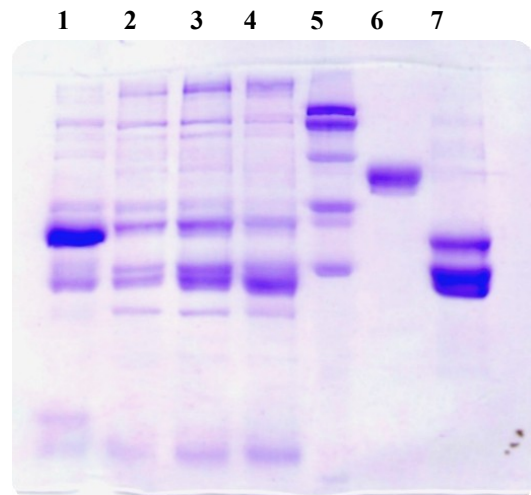
Figura 58: Caracterización de fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia dermatán sulfato por electroforesis SDS-PAGE con 2-ME. Comparación con la fracción de euglobulinas estándar.

T del gel concentrador 4 %, T del separador 8 %.

Perfil electroforético de la fracción de euglobulinas control (E-control) y euglobulinas precipitadas en presencia de 250 µg/ml de dermatán sulfato de bajo (E-DSB) o 50 µg/ml de dermatán sulfato de alto peso molecular (E-DSA). Se sembró igual volumen de las tres fracciones en estudio. Todas las muestras fueron tratadas con 2-mercaptoetanol (2-ME).

Calles:

- 1 - Plasma.
- 2 - E - control.
- 3 - E - DSB 250 µg/ml.
- 4 - E - DSA 50 µg/ml.
- 5 - Marcadores de peso molecular (212, 170, 116, 76 y 53 kDa)
- 6 - Plasminógeno estándar.
- 7 - Fibrinógeno estándar.



Los resultados obtenidos indican que estaría favorecida la precipitación de euglobulinas en presencia de dermatán sulfato, sin modificarse el patrón de proteínas precipitadas.

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis es evaluar la acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico. Como la fibrina es el sustrato final de la reacción lítica y sus características también determinan la velocidad global del proceso, en una primera etapa se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la formación y estructura de la red de fibrina y se evaluó cómo las características de las redes de fibrina obtenidas en presencia de dermatán sulfato influían en su lisabilidad.

En una segunda etapa se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad fibrinolítica, evaluando la lisis de un coágulo formado a partir de sangre entera y fracción plasmática de euglobulinas, producto del balance entre la acción de los activadores e inhibidores fibrinolíticos y las características de la red.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA FORMACIÓN, ESTRUCTURA Y LISABILIDAD DE REDES DE FIBRINA PLASMÁTICA

La formación y estabilización de la red de fibrina es el proceso por el cual el fibrinógeno soluble es convertido en un gel de fibrina insoluble por acción de trombina y FXIIIa. Este proceso ocurre en tres etapas: clivaje de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno por acción de trombina, polimerización de los monómeros de fibrina y estabilización covalente de la red por acción del FXIIIa.

En los estudios de *formación de fibrina por recalcificación del plasma y por agregado de trombina* realizados *in vitro*, se evaluaron por espectrofotometría las etapas de liberación de fibrinopéptidos y polimerización de los monómeros para formar el gel de fibrina.

Con el objetivo de caracterizar la acción anticoagulante del dermatán sulfato, se evaluó su efecto vía interacción con el cofactor II de la heparina presente en el plasma y se determinó el aspecto de las curvas de fibrinoformación obtenidas.

En todas las concentraciones ensayadas el dermatán sulfato presentó acción anticoagulante, siendo mayor el efecto observado en presencia de DSA que en presencia de DSB para la misma concentración estudiada. El efecto del dermatán sulfato sobre la formación de fibrina plasmática se caracterizó por aumento de la fase de latencia, disminución de la velocidad de fibrinoformación, prolongación del tiempo de coagulación y disminución de la densidad óptica máxima.

Los parámetros fase de latencia, velocidad de fibrinoformación y tiempo de coagulación caracterizan la cinética de fibrinoformación producto de la acción de trombina sobre el fibrinógeno; por lo tanto, el efecto observado representa la inhibición de la actividad de trombina debido a la interacción DS-CH II-trombina y la expresión del conocido efecto anticoagulante del dermatán sulfato. Por otro lado, como la densidad óptica máxima está relacionada con la estructura tridimensional de la red formada, el efecto observado estaría indicando la formación de una red de fibrina más abierta y transparente.

Las características de la red de fibrina dependen de varios factores: temperatura, pH, fuerza iónica del medio ⁽¹⁴⁶⁾, iones calcio ⁽¹⁴⁷⁾, concentración de fibrinógeno y trombina ⁽¹⁴⁸⁾ y presencia de otras proteínas plasmáticas ⁽¹⁴⁹⁾, en particular de los inhibidores de trombina⁽¹⁵⁰⁾.

Se evaluó el efecto del dermatán sulfato sobre la estructura tridimensional y la rigidez de la red de fibrina formada a partir de un *pool* de plasma, por agregado de una cantidad estandarizada de trombina y cloruro de calcio.

Para evaluar la rigidez de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato, se realizaron ensayos de **compactación**. En el caso de geles de fibrina la compactación depende de la resistencia a la ruptura de la estructura de la red y del tamaño del compartimiento líquido limitado por esa estructura. En particular, la fibrina que muestra mayor grado de compactación se considera formada por fibras más frágiles o separadas por grandes poros ⁽¹⁵¹⁾. Las geles de fibrina formados en presencia de dermatán sulfato resultaron más fácilmente compactables. Estos geles presentarían una estructura de la red constituida por fibras más frágiles y sensibles a la ruptura por efecto de fuerzas externas, separadas por compartimientos líquidos más grandes.

Se caracterizó la estructura de redes de fibrina por **microscopía electrónica**. Se evaluó el porcentaje de red, el número de fibras por campo y las dimensiones de las fibras. Las redes formadas en presencia de dermatán sulfato presentaron igual densidad de fibras, más largas y delgadas que las fibras control, resultando una arquitectura más abierta.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios de **fibrinoformación** en los que, la disminución de la densidad óptica final de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato, sugería una estructura más abierta y transparente. Es sabido que al aumentar la concentración de trombina (entre 0,05 y 0,5 U/ml) la red de fibrina aumenta su ramificación y densidad de fibras ⁽¹⁵²⁾. Teniendo en cuenta que el dermatán sulfato potencia la inhibición de trombina mediada por el cofactor II de la heparina, durante la formación de

fibrina en presencia de dermatán sulfato hay menor actividad de trombina que en el ensayo control, pudiéndose explicar por este mecanismo la generación de una red de fibrina más abierta.

Es conocido que la velocidad de fibrinólisis está relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina ⁽¹⁵³⁾. Teniendo en cuenta que la plasmina corta transversalmente fibras individuales, dentro de un mismo gel, las fibras delgadas se lisan más rápidamente que las gruesas ⁽¹⁵⁴⁾. Por otro lado, las redes de estructura abierta se lisan antes que las de estructura densa a causa de la reducida cantidad de fibras por unidad de volumen y la movilidad facilitada de los componentes fibrinolíticos ⁽¹⁴⁾.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las características observadas en las redes formadas en presencia de dermatán sulfato, podría plantearse que estas redes serían más susceptibles a la lisis.

Para evaluar esta hipótesis se diseñó una *prueba de coagulación y fibrinólisis en dos etapas* y se evaluó la lisabilidad de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato. Se decidió utilizar u-PA como activador de plasminógeno debido a que no presenta afinidad por fibrina, ya que la eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación de plasminógeno también depende de la arquitectura de la red ⁽²⁰⁾.

Se observó que las redes formadas en presencia de dermatán sulfato se lisaban más rápidamente que las redes control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico.

Existen pocos reportes respecto del estudio del efecto del dermatán sulfato sobre la estructura de la fibrina. En particular, Jones y Gabriel ⁽¹⁵⁵⁾ han estudiado el efecto del dermatán sulfato como componente de la membrana basal subendotelial sobre la estructura de la red de fibrina. Si bien las metodologías utilizadas fueron diferentes a las empleadas en esta tesis, los resultados obtenidos fueron coincidentes. Reportaron la formación de fibras más delgadas en presencia de dermatán sulfato, mediante la determinación por estudios turbidimétricos de la disminución de la relación masa/longitud (μ) en comparación con redes controles. Cabe señalar que, si bien estudiaron un rango amplio de concentraciones (100 a 6000 $\mu\text{g/ml}$) de dermatán sulfato de alto peso molecular (20 kDa), éstas fueron siempre muy superiores a las utilizadas en esta tesis (4 $\mu\text{g/ml}$).

Entre sus conclusiones, los autores plantean que la influencia de los componentes de la membrana basal sobre la estructura de la fibrina, se vincularía con la modificación de las propiedades mecánicas y la permeabilidad de los geles de fibrina obtenidos.

Al respecto, en esta tesis se determinó que la fibrina obtenida en presencia de dermatán sulfato resultaba más fácilmente compactable que la fibrina control, verificando la relación entre la estructura y las propiedades mecánicas de la red.

No se dispone de otros reportes vinculados con la influencia del dermatán sulfato sobre la fibrina, aunque resultados semejantes a los presentados en esta tesis se han reportado con otros GAGs.

Respecto de la *cinética de fibrinoformación*, con heparina de bajo peso molecular ⁽¹⁵⁶⁾ han sido reportados resultados similares a los obtenidos con dermatán sulfato.

Respecto de la *estructura de la fibrina*, coincidiendo con nuestros resultados, se ha publicado que las redes obtenidas en presencia de heparina de bajo peso molecular evaluadas por microscopía confocal, resultaron más porosas y formadas por fibras más delgadas que las control ⁽¹⁵⁷⁾. Resultados similares también fueron obtenidos con heparina no fraccionada, las redes fueron más porosas aunque formadas por fibras más gruesas^(157,158). Además, a partir de ensayos turbidimétricos, se ha reportado que en presencia de heparina de bajo peso molecular y heparán sulfato ⁽¹⁵⁶⁾ la fibrina formada fue más abierta, constituida por fibras más delgadas.

Respecto de la relación *estructura-lisabilidad* de la fibrina, en presencia de decorín (proteoglicano de dermatán sulfato) se obtuvieron redes con fibras más delgadas, cuya lisis inducida por t-PA resultó acelerada ⁽¹⁵⁹⁾.

Por otro lado, coágulos formados en presencia de heparina de bajo peso molecular, resultaron menos ramificados y con poros más grandes que los controles ⁽¹⁶⁰⁾. Los autores concluyen que el incrementando observado en la velocidad de lisis de esas redes se debe a que la elevada porosidad de la red condujo a una mejor disponibilidad de t-PA dentro de la fibrina.

Resumiendo, se ha demostrado que las redes formadas en presencia de dermatán sulfato son más frágiles y sensibles a ruptura por efecto de fuerzas externas, constituidas por compartimentos líquidos más grandes determinados por una arquitectura más abierta, caracterizada por igual densidad de fibras, más largas y delgadas que las fibras control. En

particular, estos resultados se explican teniendo en cuenta que el dermatán sulfato potencia la inhibición de trombina mediada por el cofactor II de la heparina.

Teniendo en cuenta las características observadas en las redes formadas en presencia de dermatán sulfato y, considerando que la velocidad de fibrinólisis está relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina, se planteó que estas redes serían más susceptibles a la lisis. Se corroboró la hipótesis planteada debido a que se observó que la lisis mediada por u-PA de redes formadas en presencia de dermatán sulfato resultó más rápida que la lisis de redes control.

En función de los resultados obtenidos proponemos que, debido al efecto potenciador de la inhibición de trombina mediada por el cofactor II de la heparina, el dermatán sulfato no sólo actúa como regulador de la actividad de trombina, sino además actuaría como modulador de la estructura de la fibrina y su lisabilidad.

EFEECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE EL TIEMPO DE LISIS DEL COÁGULO DE SANGRE ENTERA DILUIDA Y EL TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS

El tiempo de lisis del coágulo formado a partir de la sangre entera diluida depende principalmente de los niveles de fibrinógeno, factor XIII, plasminógeno y del equilibrio entre los activadores e inhibidores del sistema fibrinolítico. Por lo tanto, si los niveles de fibrinógeno, factor XIII y plasminógeno son normales y constantes, el tiempo de lisis depende fundamentalmente del equilibrio entre t-PA y PAI-1, ya que al diluir la sangre se minimiza el efecto del principal inhibidor de la plasmina (α_2 -antiplasmina).

Se observó una disminución del tiempo de lisis en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato y el efecto fue mayor en presencia de DSA que DSB para la misma concentración estudiada.

Si bien se realizaron agregados *ex vivo*, se utilizaron concentraciones bajas de dermatán sulfato (entre 0,2 y 10 $\mu\text{g/ml}$) dentro del orden de los niveles plasmáticos obtenidos por tratamientos farmacológicos ⁽¹⁰³⁾. Estos resultados coincidirían con los obtenidos en modelos animales de trombosis, donde el dermatán sulfato además de inhibir la formación y el crecimiento del trombo, ha mostrado reducir el peso del trombo formado en función del tiempo y la dosis ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾.

En el ensayo de lisis del coágulo de sangre entera diluida con agregado de dermatán sulfato *ex vivo* se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato. Si bien, los resultados obtenidos pueden deberse a un efecto neto sobre la activación del sistema fibrinolítico, no puede descartarse que el efecto observado sea una consecuencia del efecto anticoagulante del dermatán sulfato, ya que en esta prueba están presentes todos los componentes plasmáticos y en función de los resultados anteriormente presentados, la interacción DS-CH II puede modificar la actividad de la trombina agregada y la estructura final del coágulo.

En la prueba de lisis de euglobulinas, la dilución y acidificación del plasma produce la precipitación de la fracción proteica de euglobulinas (que contiene principalmente fibrinógeno, plasminógeno y los activadores del plasminógeno) y mediante este procedimiento se eliminan los inhibidores del sistema fibrinolítico (PAI-1 y α_2 -antiplasmina). Por lo tanto, se evalúa fundamentalmente la activación de la fibrinolisis.

Teniendo en cuenta todos los resultados hasta ahora presentados en esta tesis, el dermatán sulfato modifica la actividad de trombina, influenciando la estructura y lisabilidad de la fibrina. Por lo tanto, tiene un efecto pro-fibrinolítico asociado a su conocido efecto anticoagulante. Además, se demostró por método amidolítico que el dermatán sulfato potencia la activación del plasminógeno mediada por u-PA y t-PA, de modo que se planteó un efecto pro-fibrinolítico independiente de su rol anticoagulante.

El objetivo del ensayo de *lisis de euglobulinas* fue evaluar la activación fibrinolítica por método coagulométrico.

Lisis de euglobulinas estándar en presencia de dermatán sulfato:

Se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis en presencia de dermatán sulfato. Debido a que se realizó una adaptación de la técnica original para evaluar la etapa de fibrinoformación por espectrofotometría, se pudo descartar el efecto anticoagulante del dermatán sulfato en este ensayo y, por lo tanto, concluir que el efecto pro-fibrinolítico observado podría deberse a un efecto sobre la activación del sistema fibrinolítico.

Particularmente, teniendo en cuenta que el principal activador de plasminógeno vascular es el t-PA, se podría relacionar el efecto pro-fibrinolítico observado a un aumento de la

activación de plasminógeno por t-PA. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por método amidolítico.

Lisis de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato:

Se precipitó la fracción de euglobulinas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato y se evaluó el tiempo de lisis por espectrofotometría.

En la etapa de fibrinoformación sólo la curva asociada a la precipitación con 50 µg/ml de DSA presentó características que correspondieron a un efecto anticoagulante, por lo tanto se excluyó del análisis final. Por otro lado, las curvas de fibrinoformación asociadas a las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DSB (10 a 250 µg/ml) y DSA (10 a 25 µg/ml), se observó aumento de la fase de latencia, de la velocidad de fibrinoformación, del tiempo de coagulación y de la densidad óptica máxima. Teniendo en cuenta que estas características coinciden sólo parcialmente con el efecto anticoagulante del dermatán sulfato determinado previamente en ensayos de fibrinoformación, todas las curvas fueron consideradas para el análisis de la etapa de lisis.

Se confirmó la presencia de mayores niveles de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato, lo que explicaría la observación de un aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica final, y no se detectaron niveles de AT III y CH II en ninguna de las fracciones de euglobulinas analizadas. En particular, los resultados obtenidos indican que las redes formadas a partir de las fracciones de euglobulinas-dermatán sulfato serían más densas y cerradas que las redes formadas a partir de la fracción de euglobulinas-control.

Respecto de la etapa de lisis, se observó una disminución significativa del tiempo de lisis en presencia de 50 µg/ml de DSA y 100 y 250 µg/ml de DSB. Paralelamente, se observó un aumento de los niveles de PDF y dímero D. Además, se confirmó la presencia de mayores niveles de plasminógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de DS.

Se determinó el patrón electroforético por SDS-PAGE para las fracciones de euglobulinas control y las obtenidas en presencia de 50 µg/ml de DSA y 250 µg/ml de DSB. Los resultados obtenidos indican que estaría favorecida la precipitación de euglobulinas sin modificarse el patrón de proteínas precipitadas.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que se descartó la presencia de AT III y CH II en las fracciones de euglobulinas- dermatán sulfato, que las redes de fibrina formadas a partir de estas fracciones serían más densas y cerradas (principalmente debido al aumento de los

niveles de fibrinógeno) y que se observó una disminución del tiempo de lisis final de euglobulinas, se puede concluir que el dermatán sulfato tendría acción pro-fibrinolítica independiente del efecto anticoagulante.

Por otro lado, aunque de manera indirecta, se podría descartar que el dermatán sulfato afecte el entrecruzamiento de la red por factor XIIIa, ya que se observaron niveles de PDF y dímero D semejantes y proporcionales al aumento de fibrinógeno.

Resultados relacionados con el efecto del dermatán sulfato en el tiempo de lisis de euglobulinas fueron presentados por otros autores. Coincidiendo con nuestros resultados, Onaya *et al.* presentaron estudios *in vitro*, en los que el agregado de dermatán sulfato (5 y 50 $\mu\text{g/ml}$) a una solución de euglobulinas preparada por método convencional, producía un acortamiento significativo del tiempo de lisis. Los autores concluyeron que debido a que 5 $\mu\text{g/ml}$ de dermatán sulfato no influenciaba el APTT (Tiempo de tromboplastina parcial activado) ni el TP (Tiempo de protrombina) y que 50 $\mu\text{g/ml}$ afectaba levemente el APTT y el TP, sus resultados indicarían que el dermatán sulfato tendría efecto pro-fibrinolítico⁽¹⁶¹⁾. Por otro lado, Colucci *et al.*⁽⁹⁹⁾ en un modelo experimental de trombosis venosa en conejos, detectaron que la actividad fibrinolítica de la fracción de euglobulinas plasmática aumentaba rápidamente luego de la administración endovenosa de dermatán sulfato. Sin embargo, debido a que no pudieron detectar variaciones en la actividad de t-PA o PAI-1 en esos plasmas, concluyeron que los efectos observados se debían a un “artefacto” relacionado con la técnica de precipitación. Los autores también realizaron ensayos controles agregando dermatán sulfato (100 $\mu\text{g/ml}$) antes y después de la precipitación de la fracción de euglobulinas a partir de un *pool* de plasma de conejo y solamente recuperaron el efecto pro-fibrinolítico cuando el agregado fue realizado previamente a la precipitación. Es interesante destacar, que a pesar de no presentar los resultados en el trabajo, señalaron que las fracciones de euglobulinas obtenidas a partir de plasma normal o suplementado con dermatán sulfato, no mostraron diferencias en el patrón o intensidad de bandas de lisis por zimografía en placa de fibrina. En particular, estos resultados coincidirían con nuestra observación de que el patrón de proteínas precipitadas no se encuentra modificado.

Con respecto al efecto de otros GAGs en la precipitación de euglobulinas, Bertolesi *et al.*⁽¹³⁹⁾ reportaron que el agregado de heparina inmediatamente antes o después de obtener la fracción de euglobulinas no mostró cambios en el patrón y actividad de bandas por zimografía en placa de fibrina.

Resumiendo, se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis de euglobulinas en presencia de dermatán sulfato. Debido a que se descartó el efecto anticoagulante y, teniendo en cuenta que el principal activador de plasminógeno vascular es t-PA, se podría relacionar el efecto pro-fibrinolítico observado a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA y/o al aumento de los niveles de plasminógeno detectados en los precipitados.

Por lo tanto, en el ensayo de lisis de euglobulinas se evaluó la activación fibrinolítica por método coagulométrico, confirmando los resultados obtenidos por método amidolítico y concluyendo que el dermatán sulfato tendría efecto pro-fibrinolítico independiente del conocido efecto anticoagulante.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial in vitro evaluando la síntesis y expresión de componentes fibrinolíticos en cultivo de células endoteliales.

EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL

Se evaluó el efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre la expresión del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y de su inhibidor (PAI-1) en la célula endotelial. Se utilizó la línea celular 1G11, proveniente de células endoteliales de la microvasculatura aisladas de pulmón de ratón BALB/C, las cuales presentan morfología tipo “cobblestone” y expresan constitutivamente CD₃₁, CD₃₄, VE-caderina, ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina. La experiencia se realizó como se resume a continuación (Ver detalles en la sección *Materiales y Métodos: Evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial*).

Las células se dejaron pegar a las placas de Petri durante 2 horas y luego fueron estimuladas con DSA de modo que la concentración final en la placa resultara 4 µg/ml. Como control se reemplazó la solución de DSA por solución fisiológica. Cada ensayo fue realizado por sextuplicado.

Después de 19 horas de incubación se recogieron los sobrenadantes y las células fueron despegadas mecánicamente y lisadas por shock térmico.

Se determinó la actividad de t-PA y PAI-1 en los sobrenadantes y en los lisados celulares por método amidolítico.

Se observó que el DSA en la concentración ensayada, no produjo variaciones significativas sobre los niveles intracelulares ni en la liberación de t-PA y PAI-1 (tabla 28).

Tabla 28: Efecto del dermatán sulfato sobre la síntesis y expresión de t-PA y PAI-1 en cultivo de célula endotelial 1G11.

	t-PA (U/ml)		PAI-1 (U/ml)	
	sobrenadante	células	sobrenadante	células
DSA (4 µg/ml)	0,3 ± 0,1	2,7 ± 0,2	22,9 ± 1,1	4,1 ± 1,1
Control (SF)	0,4 ± 0,1	2,6 ± 0,2	21,2 ± 2,0	3,4 ± 1,3

Determinación de t-PA y PAI-1 por método amidolítico, en sobrenadante y lisados celulares. Se indican los resultados expresados como media ± desvío estándar ($n = 6$). Los niveles de t-PA y PAI-1 en presencia de DS respecto del control no presentaron diferencias estadísticamente significativas (*test* de *Mann-Whitney*, un p valor $< 0,05$).

Para la determinación de t-PA en los lisados celulares se realizó un tratamiento ácido para evitar que el t-PA sea rápidamente complejoado por PAI-1, mientras que este tratamiento no

pudo realizarse en los sobrenadantes debido a que el cultivo celular requiere un medio especial para su desarrollo. Por lo tanto, si bien los niveles de t-PA medidos en los sobrenadantes podrían ser falsamente menores que los reales, no se detectaron diferencias por estimulación con DSA.

Fisiológicamente, los niveles plasmáticos de t-PA libre raramente son mayores a 0,5 U/ml debido a que la mayor parte circula unido a PAI-1 y los niveles antigénicos circulantes de PAI-1 son variables y están entre 1 a 40 U/ml. Por lo tanto, los niveles de t-PA y PAI-1 detectados en cultivo celular son del orden de los niveles plasmáticos de estos componentes fibrinolíticos.

Estos resultados representan una primera etapa dentro de la evaluación del efecto del dermatán sulfato sobre la célula endotelial.

DISCUSIÓN

Estudios en diferentes modelos experimentales animales, han evidenciado que el dermatán sulfato previene la trombosis venosa, inhibiendo la formación y el crecimiento del trombo y, reduciendo el peso de un trombo formado en función del tiempo y la dosis. Como mecanismo de acción se ha propuesto que la prevención de la formación del trombo mediada por dermatán sulfato se debería a su efecto inhibitorio de la coagulación, mientras que la reducción del peso del trombo se debería principalmente a un mecanismo independiente del anticoagulante, probablemente relacionado con el sistema fibrinolítico endógeno. Sin embargo, debido a que el tratamiento con dermatán sulfato no ha mostrado cambios en los niveles plasmáticos de los activadores del plasminógeno o PAI-1, tanto en modelos animales como en voluntarios humanos sanos, se ha postulado que estaría involucrado un aumento localizado del proceso fibrinolítico.

En relación con un posible efecto pro-fibrinolítico localizado, se estudió el efecto del dermatán sulfato de alto peso molecular sobre los niveles intracelulares o la liberación de t-PA y PAI-1 en cultivo de células endoteliales 1G11. En las condiciones experimentales utilizadas (4 µg/ml) no se observaron variaciones significativas de la síntesis o expresión de t-PA y PAI-1.

Si bien los resultados obtenidos en esta tesis no apoyan directamente la hipótesis de que el dermatán sulfato tendría un efecto localizado sobre el sistema fibrinolítico endógeno, teniendo en cuenta que se utilizaron concentraciones bajas de dermatán sulfato, estos resultados no representarían información suficiente para descartar la hipótesis planteada.

Al respecto, Abbadini *et al.* ⁽¹⁰⁵⁾ mostró que el dermatán sulfato indujo la liberación de t-PA de la célula endotelial *in vivo* en un modelo de perfusión en ratas, especialmente en los primeros 2 minutos de infusión. En particular, el efecto fue dosis dependiente entre 0,1 y 0,4 mg/ml de dermatán sulfato.

Además, se ha reportado que el dermatán sulfato (20 µg/ml) en cultivo de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), aumentó la actividad de t-PA y redujo la expresión de PAI-1 ⁽¹⁰⁷⁾. Otros autores, si bien no observaron diferencias en los niveles de t-PA, detectaron una reducción significativamente de la expresión de PAI-1 ⁽¹⁰⁸⁾. Respecto de otros GAGs, en el mismo sistema experimental se observó que la heparina (90 µg/ml) aumentó los niveles de t-PA y redujo los niveles intracelulares de PAI-1, mientras que heparán sulfato y condroitín sulfato no mostraron efectos significativos ⁽¹⁰⁸⁾.

Por otro lado, resultados obtenidos en un modelo animal de trombosis inducida por laser, mostraron que la administración de dermatán sulfato inducía la lisis espontánea del coágulo y que la inyección simultánea de dermatán sulfato y t-PA presentaba un efecto mayor que el obtenido en presencia de t-PA, observando incluso un aumento en la lisis del coágulo a dosis que individualmente no habían tenido efecto significativo ⁽¹⁰⁶⁾. Los autores han propuesto que el efecto observado podría deberse a que el dermatán sulfato estimulara la liberación de t-PA de la célula endotelial favoreciendo la lisis del coágulo y representaría un efecto localizado del DS sobre la pared vascular. Este efecto podría ser considerado como una contribución adicional a la actividad antitrombótica del dermatán sulfato y apoyaría la hipótesis anteriormente planteada.

Respecto del nivel de dermatán sulfato seleccionado para este ensayo, se tuvo en cuenta que si bien, normalmente el dermatán sulfato no se encuentra en circulación, siendo casi nulos los niveles plasmáticos detectados en individuos sanos, se han reportado niveles circulantes de dermatán sulfato en mujeres embarazadas a término y en pacientes en hemodiálisis crónica, pacientes quemados y pacientes sépticos, siendo los valores plasmáticos detectados entre 0,2 y 4 µg/ml ⁽¹⁶²⁾.

Cabe recordar que el dermatán sulfato nativo es de alto peso molecular y es sintetizado principalmente por fibroblastos de la matriz subendotelial, donde cumple principalmente funciones relacionadas principalmente con la difusión de moléculas hidrosolubles, migración, proliferación y adhesión celular. El aumento de dermatán sulfato en circulación en pacientes en hemodiálisis crónica, pacientes quemados y pacientes sépticos, se debería al daño endotelial producido en las patologías mencionadas. Mientras que, el aumento de dermatán sulfato en las mujeres embarazadas se debería a la producción placentaria ^(163,164).

En las experiencias presentadas previamente demostramos que el DSA, en concentraciones similares a los niveles detectados en circulación, presenta efectos anticoagulantes en ensayos de fibrinoformación por recalcificación o agregado de trombina al plasma. Además, se observó que aumenta el grado de compactación de redes plasmáticas y afecta su estructura, dando lugar a la formación de redes más abiertas constituidas por fibras más largas y delgadas, más frágiles y sensibles a la ruptura por fuerzas externas. Se demostró que esas redes eran lisadas más fácilmente. En conjunto estas características de la red de fibrina formada en presencia de DSA indicarían que el dermatán sulfato tiene un efecto

pro-fibrinolítico, asociado a su efecto anticoagulante como potenciador del cofactor II de la heparina.

Por otro lado, en los estudios amidolíticos presentados previamente demostramos que el DSA potencia la reacción de activación de plasminógeno por t-PA y u-PA. Además, se observó que la combinación de DSA y fibrina no presenta efecto adicional sobre la reacción de activación de plasminógeno por t-PA. Si bien las concentraciones de DSA utilizadas en estos ensayos no serían comparables a las concentraciones circulantes y estos resultados fueron obtenidos en sistemas puros, podría especularse que en circulación el DSA tendría efecto antitrombótico y pro-fibrinolítico principalmente mediado por su acción anticoagulante y no debido a potenciación directa del sistema fibrinolítico, ya que no se observó estimulación de la célula endotelial en las concentraciones en que el DSA circula en plasma y en presencia de fibrina, el dermatán sulfato no tendría efecto adicional sobre la conversión de plasminógeno a plasmina mediada por t-PA, que es el principal activador vascular.

Por otro lado, centralizando el análisis en la función fisiológica del dermatán sulfato en mujeres embarazadas, cabe destacar que durante la gestación normal existe un aumento de la actividad procoagulante debido al aumento de los factores de coagulación VII, X, VIII, fibrinógeno y factor vW; y la disminución de los inhibidores de coagulación, principalmente proteína S, C y antitrombina III ⁽¹⁶⁵⁾. Además, se han reportado niveles elevados de dermatán sulfato y de cofactor II de la heparina ^(73, 162). En particular, se ha propuesto que el rol fisiológico del sistema CH II incluiría la inhibición de trombina extravascular y la regulación de trombina durante el embarazo ⁽⁶⁵⁾ y se han reportado niveles disminuidos de CH II en mujeres con pre-eclampsia (aproximadamente 50 % del valor normal en embarazo) ⁽¹⁶⁶⁾, sugiriendo una relación entre la disminución de la actividad de CH II y la disfunción placentaria.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis contribuirían al esclarecimiento del rol fisiológico del sistema DS-CH II como mecanismo de balance del estado protrombótico característico en la etapa de gestación. El dermatán sulfato actuaría no sólo como sistema regulador de la actividad de trombina, sino además como modulador de la estructura de la fibrina y su lisabilidad.

Además, durante el embarazo el sistema fibrinolítico también se encuentra desbalanceado, especialmente debido al aumento de los niveles del inhibidor del activador de

plasminógeno placentario o PAI-2 (de 0 a 260 ng/ml) ⁽³⁹⁾, y además debido al aumento de los niveles de PAI-1 (x 3), u-PA (x 17) y t-PA (x 2) ⁽¹⁶⁷⁾. Por otro lado, durante el embarazo se detectan niveles aumentados de dímero D ⁽¹⁶⁸⁾, que no pueden ser explicados teniendo en cuenta los niveles circulantes de t-PA, u-PA, PAI-1 y PAI-2 que indicarían un arresto de la fibrinólisis sistémica.

Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, una explicación de los aumentos progresivos de dímero D durante el embarazo, sería la activación del sistema plasminógeno-plasmina mediada por dermatán sulfato. El dermatán sulfato actuaría como modulador de la fibrinólisis durante el embarazo potenciando la activación de plasminógeno principalmente por u-PA.

En relación con un rol especial del sistema Plg-u-PA, se ha propuesto que el u-PA y su receptor (u-PAR) tendrían un rol central en la proteólisis dependiente de plasmina durante el desarrollo del embarazo. Los niveles de u-PA y u-PAR en tejidos gestacionales (placenta y membranas fetales) serían 100 a 200 veces mayores que los niveles detectados en plasma⁽¹⁶⁹⁾. Además, en mujeres con pre-eclampsia se han detectado niveles elevados de t-PA, niveles bajos de PAI-2 y niveles no modificados de u-PA y PAI-1 en comparación con mujeres con embarazo normal, asociando este patrón de componentes fibrinolíticos a disfunción endotelial e insuficiencia placentaria ⁽¹⁷⁰⁾.

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a explicar el rol fisiológico de dermatán sulfato, principalmente durante el embarazo:

- ✓ formando parte del sistema DS-CH II-trombina, el dermatán sulfato actuaría como modulador del estado protrombótico característico en la etapa de gestación, actuando no sólo como sistema regulador de la actividad de trombina, sino además como modulador de la estructura de la fibrina y su lisabilidad.
- ✓ potenciando la activación de plasminógeno por u-PA (DS-Plg-u-PA), actuaría como modulador de la fibrinólisis durante el embarazo.

CONCLUSIONES

El dermatán sulfato es un glicosaminoglicano sintetizado por fibroblastos de matriz subendotelial, ampliamente conocido por su acción anticoagulante a través de la interacción con el cofactor II de la heparina para potenciar la inhibición de trombina. Además, ha sido sugerido que el dermatán sulfato, aumentaría la actividad fibrinolítica. La acción pro-fibrinolítica del dermatán sulfato fue reportada por primera vez en el año 1987, cuando se observó que aumentaba la liberación de t-PA en un modelo de perfusión en ratas. Posteriormente, el dermatán sulfato fue asociado a la reducción del peso del trombo en modelos animales de trombosis, y se sugirió un mecanismo independiente de su acción anticoagulante para explicar este efecto. Además, se reportó que la reducción del peso del trombo era independiente de la inhibición del crecimiento del mismo y que este efecto era atenuado significativamente por tratamiento con inhibidores de fibrinólisis, y se propuso que el sistema fibrinolítico estaría involucrado. Sin embargo, no pudo demostrarse que por administración endovenosa de dermatán sulfato aumentara la actividad fibrinolítica sanguínea, ni se modificaran los niveles plasmáticos de los activadores o inhibidores del plasminógeno. Por lo tanto, el efecto pro-fibrinolítico propuesto fue asociado a un fenómeno localizado, probablemente relacionado con un aumento local del sistema fibrinolítico endógeno; aunque el mecanismo molecular que conduciría a la potenciación de la disolución del trombo *in vivo*, aún no ha sido dilucidado.

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto del dermatán sulfato de alto y bajo peso molecular sobre el sistema fibrinolítico y contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación planteada entre este glicosaminoglicano y el sistema plasminógeno-plasmina.

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de los principales componentes del sistema fibrinolítico, trabajando con sistemas purificados y sustratos cromogénicos sintéticos. ***Se observó un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA y u-PA en función del aumento de la concentración de dermatán sulfato. Este efecto fue corroborado a diferentes concentraciones de los activadores. En particular, el uso de productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (PDF) como control positivo de estimulación en la reacción de activación por t-PA, permite señalar que el efecto máximo observado en presencia de DSA sobre la activación de plasminógeno por t-PA y u-PA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de fibrina sobre la***

reacción de activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB, a la misma concentración estudiada, fue de menor magnitud. Además, la combinación de PDF y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de plasminógeno por t-PA.

Un mecanismo probable del efecto pro-fibrinolítico observado sería su acción potenciadora sobre la activación de plasminógeno. Sin embargo, debido a que durante el ensayo de activación de plasminógeno se registró la actividad amidolítica de la plasmina formada, el aumento de la hidrólisis del sustrato S-2251 podría deberse en parte a un aumento de la actividad de la plasmina generada. Por lo tanto, para asignar con certeza el efecto observado al proceso de activación de plasminógeno se evaluó el efecto del dermatán sulfato sobre la actividad de plasmina y *se observó que el dermatán sulfato no tenía efecto apreciable sobre la actividad de plasmina.*

Además, se estudió la conversión de plasminógeno a plasmina por electroforesis (SDS-PAGE con Urea). *Se comprobó la aparición más temprana de la banda correspondiente a plasmina acompañada de la desaparición de la banda de plasminógeno en presencia de DSA y DSB. Cabe destacar que el efecto observado fue mayor con DSA, coincidentemente con los resultados de los estudios amidolíticos.*

Por otro lado, se consideró la posibilidad de que el dermatán sulfato aumentara la actividad de los activadores del plasminógeno. *Se observó que el dermatán sulfato no modificó la actividad amidolítica de u-PA y que la conversión, por acción de plasmina, de u-PA de simple cadena (scu-PA o pro-uroquinasa) a doble cadena (tcu-PA o uroquinasa activa) tampoco fue influenciada por dermatán sulfato. Si bien no se evaluó el efecto de dermatán sulfato sobre la actividad amidolítica de t-PA, teniendo en cuenta que la magnitud del efecto del dermatán sulfato en los ensayos de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA fue similar, podría concluirse que el efecto pro-fibrinolítico observado no sería atribuible a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno en general.*

Por lo tanto, debido a que fue descartado que el efecto observado sea atribuido a un aumento de la actividad amidolítica de plasmina o a un aumento de la actividad de los activadores de plasminógeno, se puede concluir que el dermatán sulfato potenciaría de manera directa el proceso de activación de plasminógeno. Sería posible que este efecto se

deba a un cambio conformacional que facilite el acceso de los activadores del plasminógeno al sitio de activación. En particular, esta hipótesis esta basada en el hecho de que el dermatán sulfato estimuló con similar magnitud la activación de plasminógeno tanto por t-PA como por u-PA. Para evaluar esta hipótesis se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la activación de Lys-Plg por los diferentes activadores utilizados.

Los efectos observados sobre la activación de Lys-Plg fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg. El efecto potenciador observado en presencia de DSA sobre la activación de Lys-Plg por t-PA y u-PA resultó de similar magnitud al efecto obtenido en presencia de PDF utilizados como control positivo de estimulación en la reacción de activación por t-PA, mientras que el efecto del DSB fue de menor magnitud. Por lo tanto, la transición de la forma cerrada a la forma abierta del plasminógeno no sería la explicación del aumento observado sobre la reacción de activación de plasminógeno en presencia dermatán sulfato y se debería pensar en algún otro tipo de cambio conformacional o en una interacción directa entre el dermatán sulfato y los activadores del plasminógeno.

Por otro lado, se observó que la combinación de PDF y dermatán sulfato no resultó en un efecto adicional sobre la estimulación de Glu o Lys-Plg por t-PA, sugiriendo que ambas sustancias compartirían los sitios de unión sobre la molécula de t-PA y/o plasminógeno y, en particular que ese sitio de interacción no estaría relacionado con la porción N-terminal del plasminógeno. Teniendo en cuenta los sitios de unión a fibrina en las moléculas de plasminógeno y t-PA, se podría especular que los sitios involucrados en la interacción con dermatán sulfato podrían ser los dominios kringle 5 y 1 del plasminógeno y los dominios kringle 2 y finger del t-PA.

En función de estos resultados, podría plantearse que de modo análogo al rol propuesto para la fibrina en el sistema fibrinolítico, el dermatán sulfato podría actuar como una superficie que permitiera la formación de un complejo trimolecular, Plg-DS-activador, facilitando y acelerando la conversión a plasmina.

Sobre la base de un mecanismo templado, podríamos explicar las diferencias observadas entre el efecto del DSA y DSB. En presencia de un molde o templado corto que no pudiera unir simultáneamente ambas moléculas (plasminógeno y activador), el efecto global de potenciación no podría tener lugar, sin embargo podría detectarse un efecto parcial debido a la interacción entre el templado y la enzima o el sustrato. Mientras que,

en presencia de un templado suficientemente largo como para unir la enzima y el sustrato, la reacción de potenciación tendría lugar de manera eficiente.

En particular, esta hipótesis esta basada en el hecho de que en presencia de DSB el efecto observado fue de similar magnitud a distintas concentraciones de los activadores, mientras que en presencia de DSA el efecto potenciador aumentó su magnitud con el aumento de la concentración de los activadores. El DSB se uniría solamente a la molécula de plasminógeno, mientras que el DSA se uniría simultáneamente al plasminógeno y al activador (tanto u-PA como t-PA).

Se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la reacción de activación de plasminógeno (Glu-Plg y Lys-Plg) mediada por el activador exógeno estreptoquinasa (SK). Teniendo en cuenta que el mecanismo de activación por SK es diferente al mecanismo mediado por t-PA y u-PA, el análisis de estos resultados nos permitió evaluar los planteos realizados sobre el mecanismo de acción del dermatán sulfato en la etapa de activación de plasminógeno.

Se observó que el DSB potenció la activación de Glu-Plg por SK y que el DSA inhibió la reacción, ambos efectos fueron de manera concentración dependiente.

Es sabido que durante la reacción de activación de plasminógeno por SK todos los dominios de la molécula de SK participan en la formación del complejo con plasminógeno. Por lo tanto, teniendo en cuenta la diferencia entre el efecto observado en presencia de DSA y DSB, podría descartarse la interacción directa entre SK y dermatán sulfato, ya que en ese caso ambas formas de dermatán sulfato deberían haber tenido el mismo efecto. Además, como el efecto de DSB fue de similar magnitud a las diferentes concentraciones del activador utilizadas, podría plantearse que la interacción sería con la molécula de plasminógeno. Por otro lado, en función de estos resultados, podría proponerse que la interacción DS-Plg no sería sobre el sitio de unión a SK en la molécula de plasminógeno (kringle 5), ya que en ese caso ambas formas de dermatán sulfato hubieran afectado la formación del complejo de activación. Incluso, sería probable que el dermatán sulfato interaccione con la molécula de plasminógeno en un sitio distinto pero cercano al sitio de unión a SK, de modo que el DSA por su longitud interferiría en la formación del complejo de activación mientras que el DSB al tener menor longitud no afectaría esta etapa de la reacción.

En particular, la propuesta de que el dermatán sulfato interacciona con el plasminógeno esta sustentada por los datos obtenidos en los ensayos de activación de

plasminógeno por u-PA y t-PA. Además, teniendo en cuenta que los efectos combinados dermatán sulfato/PDF no resultaron aditivos se había propuesto que estarían involucrados los mismos sitios de unión a fibrina (kringle 5 y 1). Integrando estos resultados con los obtenidos en el estudio de activación de plasminógeno por SK, podría especularse que el dermatán sulfato se uniría al plasminógeno a través del dominio kringle 1.

Los efectos observados sobre la reacción de activación de Lys-Plg por SK fueron de similar magnitud a los observados previamente con Glu-Plg. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en los ensayos de activación de plasminógeno por u-PA y t-PA.

En síntesis, el uso de sistemas purificados ha permitido separar el efecto anticoagulante de las posibles acciones fibrinolíticas del dermatán sulfato y analizar diferentes etapas del proceso de activación de la fibrinólisis. *Los resultados obtenidos durante los estudios amidolíticos de activación de plasminógeno realizados, apoyan la hipótesis de que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico. Un mecanismo probable sería su acción potenciadora de la activación de plasminógeno por t-PA y uPA*

Considerando que la fibrina es el sustrato final de la reacción lítica y sus características también determinan la velocidad global del proceso, se estudió el efecto del dermatán sulfato sobre la formación y estructura de la red de fibrina y se evaluó cómo las características de las redes de fibrina obtenidas en presencia de dermatán sulfato influían en su lisabilidad.

Se caracterizó la acción anticoagulante del dermatán sulfato en ensayos de fibrinoformación. *Se observó aumento de la fase de latencia, disminución de la velocidad de fibrinoformación, prolongación del tiempo de coagulación y disminución de la densidad óptica máxima, siendo mayor el efecto observado en presencia de DSA que en presencia de DSB para la misma concentración estudiada. Los parámetros fase de latencia, velocidad de fibrinoformación y tiempo de coagulación caracterizan la cinética de fibrinoformación producto de la acción de trombina sobre el fibrinógeno; por lo tanto, el efecto observado representa la inhibición de la actividad de trombina debido a*

la interacción DS-CH II-trombina y la expresión del conocido efecto anticoagulante del dermatán sulfato. Por otro lado, como la densidad óptica máxima está relacionada con la estructura tridimensional de la red formada, el efecto observado estaría indicando la formación de una red de fibrina más abierta y transparente.

Para evaluar la rigidez de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato, se realizaron ensayos de compactación. *Las geles de fibrina formados en presencia de dermatán sulfato resultaron más fácilmente compactables. Estos geles presentarían una estructura de la red constituida por fibras más frágiles y sensibles a la ruptura por efecto de fuerzas externas, separadas por compartimientos líquidos más grandes.*

Se caracterizó la estructura de redes de fibrina por microscopía electrónica. *Las redes formadas en presencia de dermatán sulfato presentaron igual densidad de fibras, más largas y delgadas que las fibras control, resultando una arquitectura más abierta. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios de fibrinoformación en los que, la disminución de la densidad óptica final de la red de fibrina formada en presencia de dermatán sulfato, sugería una estructura más abierta y transparente.*

Considerando que la velocidad de fibrinólisis está relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina, se evaluó la lisabilidad de redes de fibrina formadas en presencia de dermatán sulfato.

Se observó que la lisis mediada por u-PA de redes de fibrina plasmática formadas en presencia de dermatán sulfato resultó más rápida que la lisis de redes control.

Además, se observó una disminución del tiempo de lisis del coágulo formado a partir de sangre entera diluida en función del aumento ex vivo de la concentración de dermatán sulfato. El efecto observado fue mayor en presencia de DSA que DSB para la misma concentración estudiada. Si bien, estos resultados pueden deberse a un efecto neto sobre la activación del sistema fibrinolítico, no puede descartarse que el efecto observado sea una consecuencia del efecto anticoagulante del dermatán sulfato, ya que en nuestros estudios previos se observó cambios de la estructura de la red de fibrina asociados a una red más abierta que consecuentemente resultó más fácilmente lisible.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que el dermatán sulfato modifica la actividad de trombina, influenciando la estructura y lisabilidad de la fibrina.

Por lo tanto, el dermatán sulfato tiene un efecto pro-fibrinolítico asociado a su conocido efecto anticoagulante.

Se realizaron ensayos de lisis de euglobulinas fue evaluar la activación fibrinolítica por método coagulométrico. *Se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis de euglobulinas en presencia de dermatán sulfato. Debido a que se realizó una adaptación de la técnica original para evaluar la etapa de fibrinoformación por espectrofotometría, se pudo descartar el efecto anticoagulante del dermatán sulfato en este ensayo y, por lo tanto, concluir que el efecto pro-fibrinolítico observado podría deberse a un efecto sobre la activación del sistema fibrinolítico. Particularmente, teniendo en cuenta que el principal activador de plasminógeno vascular es el t-PA, se podría relacionar el efecto pro-fibrinolítico observado a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por método amidolítico.*

Por otro lado, se precipitó la fracción de euglobulinas en presencia de diferentes concentraciones de dermatán sulfato y se evaluó el tiempo de lisis de euglobulinas por espectrofotometría. *Los resultados obtenidos en la etapa de fibrinoformación indicarían que las redes formadas a partir de las fracciones de euglobulinas-dermatán sulfato serían más densas y cerradas que las redes formadas a partir de la fracción de euglobulinas-control. Se confirmó la presencia de mayores niveles de fibrinógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato, lo que explicaría la observación del aumento de la velocidad de fibrinoformación y de la densidad óptica final, y no se detectaron niveles de AT III y CH II en ninguna de las fracciones de euglobulinas analizadas.*

Respecto de la etapa de lisis, se observó una disminución significativa del tiempo de lisis en presencia de dermatán sulfato. Paralelamente, se observó un aumento de los niveles de PDF y dímero D. Se confirmó la presencia de mayores niveles de plasminógeno en las fracciones de euglobulinas precipitadas en presencia de dermatán sulfato.

Se determinó el patrón electroforético por SDS-PAGE y se observó que estaría favorecida la precipitación de euglobulinas sin modificarse el patrón de proteínas precipitadas.

Resumiendo, se observó un efecto pro-fibrinolítico asociado a una disminución del tiempo de lisis de euglobulinas en presencia de dermatán sulfato. Debido a que se

descartó el efecto anticoagulante y, teniendo en cuenta que el principal activador de plasminógeno vascular es t-PA, se podría relacionar el efecto pro-fibrinolítico observado a un aumento de la activación de plasminógeno por t-PA y/o al aumento de los niveles de plasminógeno detectados en los precipitados. Por otro lado, aunque de manera indirecta, se podría descartar que el dermatán sulfato afecte el entrecruzamiento de la red por factor XIIIa, ya que se observaron niveles de PDF y dímero D semejantes y proporcionales al aumento de fibrinógeno.

Por lo tanto, en el ensayo de lisis de euglobulinas se evaluó la activación fibrinolítica por método coagulométrico, confirmando los resultados obtenidos por método amidolítico y concluyendo que el dermatán sulfato tendría efecto pro-fibrinolítico independiente del conocido efecto anticoagulante.

Además, considerando que se ha postulado que un mecanismo probable de la acción pro-fibrinolítica del dermatán sulfato sería un aumento localizado del proceso fibrinolítico, se estudió su efecto sobre la célula endotelial. *En cultivo de células endoteliales 1G11 no se observaron variaciones significativas de la síntesis o expresión de t-PA y PAI-1. Si bien estos resultados no apoyan directamente la hipótesis de un efecto localizado sobre el sistema fibrinolítico, debe tenerse en cuenta que se utilizaron concentraciones bajas de dermatán sulfato. Por lo tanto, estos resultados no representarían información suficiente para descartar la hipótesis planteada.*

Los resultados de esta tesis demuestran que el dermatán sulfato tiene efecto pro-fibrinolítico y contribuyen al esclarecimiento del mecanismo de acción de este glicosaminoglicano sobre el sistema plasminógeno-plasmina. Además, permiten plantear hipótesis sobre el rol fisiológico del dermatán sulfato.

ABREVIATURAS

Se indican por orden alfabético las abreviaturas utilizadas.

Aminoácidos

Ala, A: Alanina

Arg, R: Arginina

Asn, N: Asparagina

Asp, D: Ácido aspártico

Cys, C: Cisteína

Gln, Q: Glutamina

Glu, E: Ácido glutámico

Gly, G: Glicina

His, H: Histidina

Ile, I: Isoleucina

Leu, L: Leucina

Lys, K: Lisina

Met, M: Metionina

Phe, F: Fenilalanina

Pro, P: Prolina

Ser, S: Serina

Thr, T: Treonina

Trp, W: Triptofano

Tyr, Y: Tirosina

Val, V: Valina

2-ME: 2-mercaptoetanol

α_2 -AP: α_2 -antiplasmina

α_2 -MG: α_2 -macroglobulina

Abs: absorbancia

AH: ácido hialurónico

ANOVA: análisis de la varianza

APSAC: complejo plasminógeno estreptoquinasa anisolado

AT III: antitrombina III

α_1 -AT: α_1 -antitripsina

BAPNA: N-benzoil arginina

Ca⁺⁺: ión calcio

CH II: cofactor II de la heparina

CNBr: bromuro de cianógeno

conc. final: concentración final

CS: condroitín sulfato

C-terminal: porción carboxi-terminal

D.O.: densidad óptica

D.O. Máx.: densidad óptica máxima

DMEM: medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DS: dermatán sulfato

DSA: dermatán sulfato de alto peso molecular

DSB: dermatán sulfato de bajo peso molecular

EACA: ácido 6-aminocaproico

ECGS: *endothelial cell growth supplement*, suplemento para el crecimiento de la célula endotelial

E-control: euglobulinas precipitadas en presencia de solución fisiológica

E-DSA: euglobulinas precipitadas en presencia de DSA

E-DSB: euglobulinas precipitadas en presencia de DSB

EDTA: ácido dietilentetraminoacético

EGF: *epidermal growth factor*; factor de crecimiento epidérmico

EPCR: receptor de proteína C en célula endotelial

Estim. Com: estimulador de t-PA comercial

f: factor de potenciación

Fbg: fibrinógeno

FT: factor tisular

GAGs: glicosaminoglicanos

GalN: galactosamina

GluA: ácido glutámico

GluN: glucosamina

GLA: residuos γ carboxilados

Glu-Plg: plasminógeno nativo, con ácido glutámico N-terminal

Hep: heparina

HMWK: quinínógenos de alto peso molecular

HMW-UK: uroquinasa de alto peso molecular

Ho: hipótesis nula
H1: hipótesis alternativa
HRGP: glicoproteína rica en histidina
HS: heparán sulfato
hs: horas
HUVEC: células endoteliales de cordón umbilical humano
IdoA: ácido idurónico
K: *kringle*
KS: queratán sulfato
LBS: *lysine binding sites*; sitios de unión a lisina
LMWK: quinínógenos de bajo peso molecular
LMW-UK: uroquinasa de bajo peso molecular
LE: lisis de euglobulinas
LSE: lisis de sangre entera diluida
Lys-Plg: plasminógeno con lisina N-terminal
MEB: microscopía electrónica de barrido
MF: monómeros de fibrina
MFf: monómeros de fibrina preparados a partir de fibrinógeno purificado
MFp: monómeros de fibrina preparados a partir de plasma
min: minutos
NS: no significativo
N-terminal: porción amino terminal
PAI: inhibidor del activador del plasminógeno
PBS: *buffer* fosfato salino
PC: proteína C
PCa: proteína C activada
PD: productos de degradación
PDF: productos de degradación de fibrina y fibrinógeno
pdf: productos de degradación de fibrinógeno
PDFbg: productos de degradación de fibrinógeno
PDFbn: productos de degradación de fibrina
PK: precalicreína
Plg: plasminógeno
Plm: plasmina

PM: peso molecular

p-NA: 4-nitroanilina

pro-UK: pro-uroquinasa o scu-PA

PS: proteína S

RCL: *reactive center loop*; sitio reactivo

rt-PA: t-PA recombinante

ru-PA: u-PA recombinante

sct-PA: activador de plasminógeno de tipo tisular de una sola cadena

scu-PA: activador de plasminógeno de tipo urinario de una sola cadena

SDS: dodecil-sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en poliacrilamida SDS

SF: solución fisiológica

SFB: suero fetal bovino

SK: estreptoquinasa

t_{1/2}: tiempo asociado al 50% de la reacción

TAFI: inhibidor de fibrinólisis activado por trombina

tct-PA: activador de plasminógeno de tipo tisular de dos cadenas

tcu-PA: activador de plasminógeno de tipo urinario de dos cadenas

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular

TLE: tiempo de lisis de euglobulinas

TM: trombomodulina

t-PA: activador de plasminógeno de tipo tisular

UK: uroquinasa

u-PA: activador de plasminógeno de tipo urinario

V: velocidad de reacción

VLE: velocidad de lisis de euglobulinas

V_o: velocidad inicial

VTN: vitronectina

vW: factor von Willebrand

ZPI: inhibidor dependiente de proteína Z

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-**Rodgers GM. Endothelium and the regulation of hemostasis. En: Lee GR, Foerster J, Lukens JN, Paraskevas, Creer, Rodgers, editors. Wintrobe's clinical hematology. Baltimore, Maryland, EE.UU.; 1999. p. 684-764.
- 2.-**Tracy PB. Role of platelets and leukocytes in coagulation. En Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 575-96.
- 3.-**Martinuzzo M, Cerrato G, Forastiero R. Fisiología de la hemostasia. En Kordich L, editor en jefe. Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. Grupo CAHT. 1^{ra} edición 2003. p. 8-16.
- 4.-**Jenny NS, Mann KG. Coagulation cascade: an overview. En Lozcalzo J, Schafer AI, editors. Thrombosis and Hemorrhage. Baltimore, Maryland, USA. 2nd edition 1998. p. 3-28.
- 5.-**Colman RW, Clowes AW, George JN, et al. Overview of hemostasis. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 3-20.
- 6.-**Hall CE, Slayter HS. The fibrinogen molecule: its size, shape and mode of polymerization. J Biophys Biochem Cytol 1959; 5:11.
- 7.-**Weisel JW, Stauffacher CV, Bullita E *et al.* A model for fibrinogen: domains and sequence. Science 1985; 230: 1388:91.
- 8.-**Lewis SD, Shields PP, Shafer JA. Characterization of the kinetic pathway for liberation of fibrinopeptides during assembly of fibrin. J Biol Chem 1985; 260: 10192-9.
- 9.-**Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost 2005; 3: 1894-1904
- 10.-**Greenberg CS, Sane DC, Lai TS. Factor XIII and fibrin stabilization. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 317-34.
- 11.-**Mosesson MW. Cross-linked gamma-chains in fibrin fibrils bridge transversely between strands: yes. J Thromb Haemost 2004; 2: 388.

- 12.- Weisel JW. Cross-linked gamma-chains in fibrin fibrils bridge transversely between strands: no. J Thromb Haemost 2004; 2: 394.
- 13.- Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. Thromb Haemost 1999; 82 (2): 259-70.
- 14.- Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. Thromb Haemost 2003; 89: 610-21.
- 15.- Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin. Thromb Haemost 2005; 93: 647-54.
- 16.- Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. Blood Coagul Fibrinolysis 1992; 3: 605-14.
- 17.- Cockell CS, Marshall JM, Dawson KM, et al. Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. Biochem J 1998; 333 (1): 99-105.
- 18.- Mantel WF, Lin BH, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. Science 1999; 248 (4951): 69-73.
- 19.- Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. J Biol Chem 1985; 260 (22): 12106-11.
- 20.- Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure in fibrinolysis. J Biol Chem 1992; 267: 24259-63.
- 21.- Grimaudo V, Hauert J, Bachmann T, et al. Diurnal variation of the fibrinolytic system. Thromb Haemost 1988; 59: 495-9.
- 22.- Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanism of initiation of fibrinolysis by fibrin. Thromb Haemost 2003; 89: 409-19.
- 23.- Longstaff C, Clough AM, Gaffney PJ. Kinetic of plasmin activation of single chain urinary-type plasminogen activator (scu-PA) and demonstration of a high affinity interaction between scu-PA and plasminogen. J Biol Chem 1992; 267 (1): 173-9.
- 24.- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. Contact system. New concepts on activation mechanism and bioregulatory functions. Biochemistry 2002; 67 (1): 13-24.
- 25.- Binder BB, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. Thromb Haemost 2007; 97: 336-42.
- 26.- Mazziere R, Blasi F. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. Thromb Haemost 2005; 93: 641-6.

- 27.- Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, *et al.* Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 2005; 93: 676-81.
- 28.- Lijnen HR, Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Haemost* 1991; 66 (1): 88-110.
- 29.- Loy JA, Lin X, Schenone M, *et al.* Domains interactions between streptokinase and human plasminogen. *Biochemistry* 2001; 40: 14686-95.
- 30.- Bean RR, Verhamme IM, Bock PE. Role of the streptokinase alpha-domain in the interactions of streptokinase with plasminogen and plasmin. *J Biol Chem* 2005; 280 (9): 7504-10.
- 31.- Weitz JI, Stewart RJ, Fredenburgh JC. Mechanism of action of plasminogen activators. *Thromb Haemost* 1999; 82 (2): 974-82.
- 32.- Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents. *Thromb Haemost* 2005; 93: 627-30.
- 33.- Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 35-45.
- 34.- Lawrwnw DA, Berkenpas MB, Palanappan S, *et al.* Localization of vitronectin binding domain in plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1994; 269 (21): 15223-8.
- 35.- Björquist P, Ehnebom J, Inghardt T, *et al.* Epitopes on plasminogen activator inhibitor type-1 important for binding to tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1341: 87-98.
- 36.- Ehrlich HJ, Gebbink RK, Keijzer J, *et al.* Elucidation of structural requirements on plasminogen activator inhibitor-1 for binding to heparin. *J Biol Chem* 1992; 267 (16): 11606-11.
- 37.- Preissner KT, Jenne D. Structure of vitronectin and its biological role in haemostasis. *Thromb Haemost* 1991; 66 (1): 123-32.
- 38.- Keijzer J, Linders M, Wegman JJ, *et al.* On the target specificity of plasminogen activator inhibitor 1: the role of heparin, vitronectin, and the reactive site. *Blood* 1991; 78: 1254-61.
- 39.- Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet A, *et al.* Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 2: 460-6.
- 40.- Medcalf RL, Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J* 2005; 272: 4858-67.
- 41.- Geiger M. Protein C inhibitor, a serpin with functions in- and outside vascular biology. *Thromb Haemost* 2007; 97: 343-7.

- 42.- Scout RW, Bergman BL, Bajpai A, *et al.* Proteasa Nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 1985; 260 (11): 7029-34.
- 43.- Frank PS, Douglas JT, Locher M, *et al.* Structural/functional characterization of the α_2 -antiplasmin inhibitor C-terminal peptide. *Biochem* 2003; 42:1078-85.
- 44.- Wang H, Yu A, Wiman B, *et al.* Identification of amino acids in antiplasmina involved in its noncovalent lysine-binding-site dependent interaction with plasmin. *Eur J Biochem* 2003; 270: 2023-9.
- 45.- Kimura S, Auki N. Cross-linking site in fibrinogen for α_2 -antiplasmin inhibitor. *J Biol Chem* 1986; 261: 15591-95.
- 46.- Hart JP, Pizzo SV. α -Macroglobulins and kunins. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice.* Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 395-407.
- 47.- Mao SS, Cooper CM, Wood T, *et al.* Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1999; 274 (49): 35046-52.
- 48.- Boffa MB, Bell R, Stevens WK, *et al.* Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 2000; 275 (17): 12868-78.
- 49.- Bruma BN, Marx PF, Mosnier LO, *et al.* Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res* 2001; 101: 329-54.
- 50.- Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. Proteoglycans. Structure and function. En Hay ED, editor. *Cell biology of extracellular matrix.* New York, USA: Plenum Press; 1991. p. 45-78.
- 51.- Fareed J, Hoppensteadt D, Walenga JM, *et al.* Molecular and functional heterogeneity in dermatan sulfate preparations. *Sem Thromb Hemost* 1991; 17 (2): 174-80.
- 52.- Jaques LB. Glycosaminoglycans as polyelectrolites: rejuvenation of original concepts. *Sem Thromb Hemost* 1991; 17: 1-4.
- 53.- Casu B. Structural features and binding properties of chondroitin sulfates, dermatán sulfate, and heparan sulfate. *Sem Thromb Hemost* 1991; 17: 9-14.

- 54.-** Hascall VC, Heinegard DK, Wight TN. Proteoglycans. Metabolism and pathology. En Hay ED, editor. Cell biology of extracellular matrix. New York, USA: Plenum Press; 1991. p. 149-175.
- 55.-** Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. Annu Rev Biochem 1991; 60: 443-75.
- 56.-** Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. Physiological reviews 2000; 80 (4): 1267-90.
- 57.-** Peplow PV. Glycosaminoglycan: a candidate to stimulate the repair of chronic wounds. Thromb Haemost 2005; 94: 4-16.
- 58.-** Esmon CT. Protein C, protein S, and trombomodulina. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 335-53.
- 59.-** Van Meijer M, Smilde A, Tans G, *et al.* The suicide substrate reaction between plasminogen activator inhibitor 1 and thrombin is regulated by cofactors vitronectin and heparin. Blood 1997; 90: 1874-82.
- 60.-** Casu B, Naggi A, Torri G. Chemical derivatization as a strategy to study structure-activity relationships of glycosaminoglycans. Sem Thromb Hemost 2002; 28 (4): 335-42.
- 61.-** Jenny NS, Lundblad RL, Mann KG. Thrombin. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 193-214.
- 62.-** Bovil EG, Tracy RP, Hayes TE, *et al.* Evidence that meizothrombin is an intermediate product in the clotting of whole blood. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 12: 754-8.
- 63.-** Huntington JA. Mechanism of glycosaminoglycan activation of serpins in hemostasis. J Thromb Haemost 2003; 1: 1535-49.
- 64.-** Tollefsen DM, Zhang L. Heparin and vascular proteoglycans. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 271-83.
- 65.-** Bock SC. Antithrombin III and heparin cofactor II. En Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, and George JN, editors. Hemostasis and Thrombosis. Basic

Principles and clinical practice. Philadelphia, LA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 235-48.

- 66.- Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* 1982; 257 (5): 2162-9.
- 67.- Han JH, Cote HCF, Tollefsen DM. Inhibition of meizothrombin and meizothrombin (des F1) by heparin cofactor II. *J Biol Chem*. 1997; 272: 28660-5.
- 68.- Tollefsen DM, Pestka CA, Monafó WJ. Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J Biol Chem* 1983; 258(11): 6713-6.
- 69.- Tollefsen DM. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb Haemost* 1995; 74 (5): 1209-14.
- 70.- Bedayan P, Boccalon H, Dupouy D, Boneu B. Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins. *Thromb Haemost* 1994; 71 (5): 576-80.
- 71.- Maimone MM, Tollefsen DM. Structure of dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. *J Biol Chem* 1990; 265 (30): 18263-71.
- 72.- Rossi EB, Duboscq CL, Kordich LC. Cofactor II de la heparina (HC II), un inhibidor de trombina cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido. *Medicina* 1999; 59: 95-104.
- 73.- Andrew MA, Mitchell L, Berry L, *et al.* An anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan circulates in pregnant woman and her fetus. *J Clin Invest* 1992; 89(1): 321-6.
- 74.- Delorme MA, Saees N, Sevick A, Mitchell L, *et al.* Plasma dermatan sulfate proteoglycan in a patient on chronic hemodialysis. *Blood* 1993; 82: 3380-5.
- 75.- Rossi E, Duboscq C, Peragallo M, and Kordich L. Heparin cofactor II (HC II) and dermatan sulfate plasmatic levels in acute burnt patients. *Thromb Haemost* 1997; Suppl.: 435.
- 76.- Duboscq C, Rossi E, Quintana I, Kordich L. Actividad del cofactor II de la heparina y concentración de dermatán sulfato en pacientes sépticos. *Medicina* 1994; 54(5/2): 509.
- 77.- Prandoni P, Meduri F, Cuppini S, *et al.* Dermatan sulphate: a safe approach to prevention of post operative deep vein thrombosis. *Br J Surg* 1992; 79: 505-9.
- 78.- Agnelli G, Cosmi B, Di Filippo P, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dermatan sulfate for prevention of deep vein thrombosis in hip fracture. *Thromb Haemost* 1992; 67: 203-8.

- 79.-** Cohen AT, Phillips MJ, Edmondson RA, *et al.* A dose ranging study to evaluate dermatán sulphate in preventing deep vein thrombosis following total hip arthroplasty. *Thromb Haemost* 1994; 72: 793-8.
- 80.-** Di Carlo V, Agnelli G, Prandoni P, *et al.* Dermatan sulphate for the prevention of postoperative venous thromboembolism in patients with cancer. *Thromb Haemost* 1999; 82 (1): 30.4.
- 81.-** Attanasio E, Russo P, Carunchio G, and Caprino L. Dermatan sulfate *versus* unfractionated heparin for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing surgery for cancer. A cost-effectiveness analysis. *Pharmacoeconomics*, 2001; 19(1): 57-68.
- 82.-** Kretz J, Chakje N, Wiesel ML, *et al.* The treatment of deep vein thrombosis with intravenous low-molecular-weight dermatan sulphate (Desmin). A pilot study. *Thromb Res* 1996; 84(6): 391-8.
- 83.-** Von Kemp K, Jochmans K, Tussenbroek F, *et al.* Desmin (a low molecular weight dermatan sulfate) versus heparin in treatment of patients with deep venous thrombosis. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54(2): 133-9.
- 84.-** Taliani MR, Agnelli G, Nenci GG, Gianese F. Dermatan sulfate in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1999; 104: 87-9.
- 85.-** Imberti D, Verso M, Silvestrini E, *et al.* Successful treatment with dermatan sulfate in six patients with heparin-induced thrombocytopenia and acute venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2696-7.
- 86.-** Ryan KE, Lane DA, Flynn A, *et al.* Antithrombotic properties of dermatan sulphate (MF 701) in haemodialysis for chronic renal failure. *Thromb Haemost* 1992; 68(5): 563-9.
- 87.-** Boccardo P, Melacini D, Rota S, *et al.* Individualized anticoagulation with dermatan sulphate for haemodialysis in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (11): 2349-54.
- 88.-** Cofrancesco E, Boschetti C, Leonardi P, *et al.* Dermatan sulphate for the treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) in acute leukemia: a randomized, heparin-controlled, pilot study. *Thromb Res* 1994; 74: 65-75.
- 89.-** Barbanti M, Calani F, Babbini M, *et al.* Antithrombotic activity of Desmin 370 comparison with a high molecular weight dermatan sulphate. *Thromb Res* 1993; 71: 417-22.

- 90.-** Ferrari GP, Marchesini D, Maggi AP. Preliminary chemical, biochemical, and pharmacological characterization of a low molecular weight dermatan sulphate. *Carbohydr Res* 1994; 255: 125-32.
- 91.-** Fernandez F, Van Ryn J, Ofosu FA, *et al.* The haemorrhagic and antithrombotic effects of dermatan sulphate. *Br J Haematol* 1986; 64 (2): 309-17.
- 92.-** Maggi A, Abbadini M, Pagella PG, *et al.* Antithrombotic properties of dermatan sulphate in a rat venous thrombosis model. *Haemostasis* 1987; 17 (6): 329-35.
- 93.-** Van Ryn-McKenna J, Weber EGE, Ofosu FA, Buchanan MR. Effects of sulfated polysaccharides on inhibition of thrombus formation initiated by different stimuli. *Thromb Haemost* 1989; 61(1): 7-9.
- 94.-** Carrie D, Caranobe C, Gabaig AM, *et al.* Effects of heparin, dermatan sulphate and of their association on the inhibition of venous thrombosis growth in the rabbit. *Thromb Haemost* 1992; 68(6): 637-41.
- 95.-** Santoro FM, Alvarez R, Fussi F. Pharmacological profile of a native dermatan sulphate. *Thromb Res* 1992; 67(2): 201-11.
- 96.-** Van Ryn-McKenna J, Ofosu FA, Gray E, *et al.* Effects of dermatan sulphate and heparin on inhibition of thrombus growth in vivo. *Ann NY Acad Sci* 1989; 556: 304-12.
- 97.-** Barbanti M, Calanni F, Milani MR, *et al.* Therapeutic effect of a low molecular weight dermatan sulphate (Desmin 370) in rat venous thrombosis. Evidence for an anticoagulant-independent mechanism. *Thromb Haemost* 1993; 69(2): 147-51.
- 98.-** Colucci M, Sardella L, Barbanti M, *et al.* Thrombolysis enhancing activity of a low molecular weight dermatan sulfate (Desmin 370) in experimental pulmonary embolism in rats. *Thromb Res* 1997; 87(5): 441-6.
- 99.-** Colucci M, Rossiello MR, Barbanti M, *et al.* Prevention and therapy of experimental venous thrombosis in rabbits by Desmin 370. *Thromb Haemost* 1998; 80: 338-41.
- 100.-** Barbanti M, Calanni F, Marchi E, *et al.* Desmin 370, a low molecular weight dermatan sulphate, reduces the weight of performed thrombi in rats made afibrinogenemic by ancrod. *Thromb Haemost* 1995; 73(2): 287-90.
- 101.-** Bell WR, Bolton G, Pitney CRM. The effect of ancrod on blood coagulation factors. *Br J Haematol* 1968; 15: 589-602.
- 102.-** Tripodi A, Moia M, Bottasso B, *et al.* Effects of subcutaneously administered dermatan sulfate (MF 701) on the coagulation and fibrinolytic parameters of healthy volunteers. *Thromb Res* 1991; 62(6): 663-72.

- 103.-** Dettori AG, Galli G, Manotti C, and Palazzini E. Pharmacological activity of a low molecular weight dermatan sulfate (Desmin) in healthy volunteers. *Semin Thromb Hemost* 1994; 20(3): 259-65.
- 104.-** Harenberg J, Jeschek M, Acker M, et al. Effect of low-molecular-weight dermatan sulphate on coagulation, fibrinolysis and Tissue Factor Pathway Inhibitor in healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7(1): 49-56.
- 105.-** Abbadini M, Zhu GJ, Maggi A, *et al.* Dermatan sulphate induces plasminogen activator release in perfused rat hindquarters. *Blood* 1987; 70(6): 1858-60.
- 106.-** Krupinski K, Bielawiec M, Yoshida K, *et al.* Dermatan sulphate enhances lysis of laser induced thrombus in vivo. *Thromb Res* 1998; 91: 199-202.
- 107.-** Yan Du H, Li Ji S, Feng Song H, *et al.* The relationship between the structure of dermatan sulfate derivatives and their antithrombotic activities. *Thromb Res* 2007; 119 (3): 377-84.
- 108.-** Marsh NA, Minter AJ, Chesterman CN. The effect of heparin and other glycosaminoglycans on levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Blood Coag Fibrinolysis* 1990; 1(2): 133-8.
- 109.-** Kyogashima M, Onaya J, Miyauchi S, *et al.* Antithrombotic activity of avian crown dermatan sulphate. *Thromb Res* 1999; 96: 459-65.
- 110.-** Wilson MW, Pringle BH. Experimental studies of the agar-plate precipitin test of Ouchterlony. *J Immunol* 1954; 73 (4): 232-43.
- 111.-** Laemmli KV. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 112.-** Lowry OH, Roseborough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurements with Folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 267-75.
- 113.-** Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 1970; 170: 1095-6.
- 114.-** Sherry S, Troll W. The action of thrombin on synthetic substrates. *J Biol Chem* 1954; 208: 95-105.
- 115.-** Erlanger BF, Kokowski N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 1961; 95: 271-8.
- 116.-** Svendsen L, Blomback B, Blomback M, Olsson P. Synthetic chromogenic substrates determination of trypsin, thrombin-like enzymes. *Thromb Res* 1972; 1: 267-78.

- 117.- Friberger P, Knos M, Gustavsson S, *et al.* Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. *Haemostasis* 1978; 7: 138-45.
- 118.- Bachmann F. Plasminogen-Plasmin enzyme system. En Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, and George JN, editors. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and clinical practice.* Philadelphia, LA, EE.UU.: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 275-320.
- 119.- Gaffney PJ. Standards in fibrinolysis. Current status and future challenges. *Thromb Haemost* 1995; 74 (6): 1389-97.
- 120.- Ryken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 2920.
- 121.- Métodos de estudio del fibrinógeno. En Kordich LC, Sánchez Avalos J, Vidal H, de Campos Guerra C, editores. *Manual de Hemostasia y Trombosis.* Grupo CLAHT, La Plata, Buenos Aires, Argentina; 1990. p. 279-85.
- 122.- Tillett WS, Garner RL. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933; 68: 4885-502.
- 123.- Takada A, Takada Y, Sugawara Y. Effects of fibrinogen and fibrin on the activation of Glu- and Lys-Plasminogen by urokinase. *Thromb Res* 1984; 33:561-9.
- 124.- Pruebas globales de orientación en coagulación. En Kordich LC, Sánchez Avalos J, Vidal H, de Campos Guerra C, editores. *Manual de Hemostasia y Trombosis.* Grupo CLAHT, La Plata, Buenos Aires, Argentina; 1990. p. 150.
- 125.- Jim RT. A study of the plasma thrombin time. *J Lab Clin Med* 1957; 50: 45-60.
- 126.- Nair CH, Shats EA. Compaction as a method to characterize fibrin network structure: kinetic studies and relationship to crosslinking. *Thromb Res* 1997; 88: 381-7.
- 127.- Nair AH, Azhar A, Dhall DP. Studies on fibrin network structure in human plasma. Part One: methods for clinical application. *Thromb Res* 1991; 64: 455-76.
- 128.- Lauricella AM, Quintana I, Kordich L. Effect of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. *Thromb Res* 2002; 107:75-9.
- 129.- Fearnley G, Balm F, Fearnley E. Evidence of diurnal fibrinolytic rhythm with a simple method of measuring natural fibrinolysis. *Clin Science* 1957; 16: 645-7.
- 130.- Kowalski E, Kopec M, Niewiarowski S. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis. *J Clin Pathol* 1959; 12: 215.

- 131.-** Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, *et al.* A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cells lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (8): 1599-604.
- 132.-** Paques EP, Stohr HA, Heimburger N. Study on the mechanism of action of heparin and related substances on the fibrinolytic system: relationship between plasminogen activators and heparin. *Thromb Res* 1986; 42: 797-807.
- 133.-** Takada Y, Urano T, Takada A. Effects of heparan sulfated analogue or other sulphate polysaccharides on the activation of plasminogen by t-PA and u-PA. *Thromb Res* 1994, 73(5): 301-11.
- 134.-** Edelberg JM, Weissler M, Pizzo SV. Kinetic analysis of the effects of glycosaminoglycans and lipoproteins on urokinase-mediated plasminogen activation. *Biochem J* 1991; 276: 785-91.
- 135.-** Rydzewski A, Takada Y, Takada A. Stimulation of plasmin catalyzed conversion of single-chain to two chain urokinase-type plasminogen activator by sulphated polysaccharides. *Thromb Haemost* 1989, 62(2): 752-5.
- 136.-** Dosne AM, Bendetowitz AV, Kher A, Samama M. Marked potentiation of the plasminogenolytic activity of pro-urokinase by unfractionated heparin and low molecular weight heparin. *Thromb Res* 1988; 51: 627-30.
- 137.-** Andrade-Gordon P, Strickland S. Interaction of heparin with plasminogen activators and plasminogen: Effects on the activation of plasminogen. *Biochem* 1986; 25: 4033-40.
- 138.-** Edelberg JM, Pizzo SV. Kinetic analysis of the effects of heparin and lipoproteins on the tissue plasminogen activator mediated plasminogen activation. *Biochemistry* 1990; 29: 5906-11.
- 139.-** Bertolesi GE, Farías EF, Alonso DF, *et al.* Insight into the profibrinolytic activity of heparin: effects on the activation of plasminogen mediated by urokinase. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 403-10.
- 140.-** Stein PL, Van Zonneveld AJ, Pannekoek H, Strickland S. Structural domains of human-type plasminogen activator that confer stimulation by heparin. *J Biol Chem* 1989; 264(26): 15441-4.
- 141.-** Stephens RW, Bokman AM, Myohanen HT, *et al.* Heparin binding to the urokinase kringle domain. *Biochem* 1992; 31: 7572-9.

- 142.-** Soeda S, Kakiki M, Shimeno H, *et al.* Localization of the binding sites of porcine tissue-type plasminogen activator and plasminogen to heparin. *Biochim Biophys Acta* 1987; 916 (3): 279-87.
- 143.-** Liang JF, Li Y, Yang V. The potential mechanism for the effect of heparin on tissue plasminogen activator - mediated plasminogen activation. *Thromb Res* 2000; 97: 349-58.
- 144.-** Andrade-Gordon P, Strickland S. Anticoagulant low molecular weight heparin does not enhance the activation of plasminogen by t-PA. *J Biol Chem* 1989; 264(26): 15177-81.
- 145.-** Edelberg JM, Weissler M, Pizzo SV. Heparin oligosaccharides enhance t-PA: a correlation between oligosaccharide length and stimulation of plasminogen activation. *Biochem* 1991; 30: 10999-11003.
- 146.-** Nair AH, Shah GA, Dhall DP. Effect of temperature, pH and ionic strength and composition on fibrin network structure and its development. *Thromb Res* 1986; 42: 809-16.
- 147.-** Okada M, Blomback B. Calcium and fibrin structure. *Thromb Res* 1983; 29 (3): 269-80.
- 148.-** Blomback B, Carlsson K, Hessel B, *et al.* Native fibrin networks observed by 3 D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110.
- 149.-** Nair AH, Azhar A, Dhall DP. The effect of some plasma proteins on fibrin network structure. *Blood Coagul and Fibrinolysis* 1991; 1 (4-5): 469-73.
- 150.-** Elgue G, Sanchez J, Fatal K, *et al.* The effect of plasma antitrombin concentration on thrombin generation and fibrin gel structure. *Thromb Res* 1994; 75 (2): 203-12.
- 151.-** Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N. *et al.* End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with a B beta-chain extension lead to fragile clot structure. *Blood* 2000; 96 (12): 3779-85.
- 152.-** Lauricella AM. Variabilidad de las redes de fibrina. Review. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41 (1):000-00. En prensa.
- 153.-** Weisel J, Veklich Y, Collet J, *et al.* Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 1999; 82 (2): 277-82.
- 154.-** Collet JP, Park D, Lesty C, *et al.* Influence of fibrin network conformation and fibrin fibre diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-61.

- 155.-** Jones M, Gabriel DA. Influence of subendothelial basement membrana components on fibrin assembly. *J Biol Chem* 1988; 263 (15): 7043-8.
- 156.-** Carr ME, Powers PL. Effect of glycosaminoglycans on thrombin- and atroxin-induced fibrin assembly and structure. *Thromb Haemost* 1989; 62 (4): 1057-61.
- 157.-** Collen A, Smorenburg SM, Peters E, *et al.* Unfractionated and low molecular weight heparin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-200
- 158.-** Collet JP, Misal Z, Vasse M, *et al.* Pharmacological approaches of fibrin gel architecture modulation and thrombus degradation: its implication in atherogenesis and thromboembolism disease. *Thromb Res* 1994; 75 (3): 353-9.
- 159.-** Dugan TA, Yang VW, Bc Qullan DJ, Hook M. Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem* 2006; 281 (50) 38208-16.
- 160.-** Varin R, Mirshahi S, Mirshahi P, *et al.* Clot structure modification by fondaparinux and consequence on fibrinolysis: a new mechanism of antithrombotic activity. *Thromb Haemost* 2007; 97 (1): 27-31.
- 161.-** Anaya J, Kyogashima M, Sakai T, *et al.* Dermatan sulfate as a bifunctionla antithrombotic. *Cardiovascular Drugs Reviews* 1999; 17 (3): 225-36.
- 162.-** Rossi E, Kordich L. Tesis de doctorado en Química Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1999.
- 163.-** Giri TK, Tollefsen DM. Placental dermatán sulfate: isolation, anticoagulant activity, and association with heparin cofactor II. *Blood* 2006; 107 (7): 2753-8.
- 164.-** Brennan MJ, Oldberg A, Pierschbacher MD, *et al.* Chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan in human fetal membranes: demonstration of an antigenically similar proteoglycan in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1984; 259: 13742-50.
- 165.-** Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thrombosis Research* 2004; 114: 409-14.
- 166.-** Bellart J, Gilabert R, Cabero L, *et al.* Heparin cofactor II: a new marker for pre-eclampsia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 205-8.
- 167.-** Koh CL. Enhanced PAI-1 levels from early second trimester and during labour and plasminogen activators in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 2002 87: 175-6.
- 168.-** Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Sem Thromb Hemost* 2003; 29 (2): 125-30.
- 169.-** Uszynski M, Perlik M, Uszynski W, *et al.* Urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in gestacional tissues; measurements and clinical implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114 (1): 54-8.

170.- Roes EM, Sweep CG, Thomas CM, *et al.* Levels of plasminógeno activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2002; 187 (4): 1019-25.

DIFUSIÓN de RESULTADOS

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

“Insight into the profibrinolytic activity of dermatan sulfate: effects on the activation of plasminogen mediated by tissue-type and urinary-type plasminogen activator”

Castañon MM, Gamba C, Kordich L.

Thrombosis Research (2007), doi: 10.1016/j.thromres.2006.12.014.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

○ PREMIOS OBTENIDOS

Mención Especial de la sesión de Comunicaciones orales en el VII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis (Grupo CAHT).

Fecha: 25 al 27/10/06. Buenos Aires, Argentina.

“Efecto del Dermatógeno Sulfato sobre la activación de Lys-plasminógeno mediada por u-PA y t-PA”

Castañon MM y Kordich L.

Resumen en Acta Bioquímica Clínica 2006, Supl 5: 64.

Mejor Trabajo presentado en el V Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis (Grupo CAHT).

Fecha: 25 al 27/09/02. Buenos Aires, Argentina.

“Estudio in vitro de la acción del Dermatógeno Sulfato sobre la activación del plasminógeno por uroquinasa”

Castañon MM, Gamba C y Kordich L.

Resumen en Acta Bioquímica Clínica 2002, Supl 3: 85.

• OTROS TRABAJOS PRESENTADOS

“Dermatógeno Sulfato como modulador de la activación de plasminógeno por t-PA”

Castañon MM; Gamba C y Kordich L.

XIX Congreso Internacional de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLAHT).

Fecha: 03 al 06/11/05. Viña del Mar, Chile

“Dermatán Sulfato como modulador de la activación de plasminógeno por estreptoquinasa”

Castañón M.M.; Gamba C y Kordich L.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

Fecha: 19 al 22/11/03. Mar del Plata, Argentina.

Resumen en Medicina 2003, vol 63, N° 5/2: 553.

“Efecto del Dermatán Sulfato en la formación y lisis de redes de fibrina”

Lauricella AM; Castañón M.M.; Gamba C; Usach V y Kordich L.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

Fecha: 19 al 22/11/03. Mar del Plata, Argentina.

Resumen en Medicina 2003, vol 63, N° 5/2: 655.

“Optimización de la reacción de activación de plasminógeno mediada por el activador tisular del plasminógeno (t-PA): estimuladores solubles”

Gamba C., Castañón M.M., y Kordich L.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

Fecha: 19 al 22/11/03. Mar del Plata, Argentina.

Resumen en Medicina 2003, vol 63, N° 5/2: 527.

“Estudio cinético de la acción del Dermatán Sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de plasmina”

Castañón, M.M., Kordich, L.C.

Hemasur 2001. II Congreso de las Sociedades de Hematología del Mercosur. XV Congreso Argentino de Hematología (SAH).

Fecha: 31/10 al 03/11/01. Mar del Plata, Argentina.

Resumen en Hematología 2001, vol 5, Nro 2: 98.

“Acción del Dermatán Sulfato de alto y bajo peso molecular sobre la actividad de plasmina in vitro”

Castañón M. y Kordich L.

XVII Congreso Internacional de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLAHT).

Fecha: 6 al 9/10/01. Ciudad de México, México.