



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

*Caracterización funcional y estructural
de un fibrinógeno de paciente con
presunto diagnóstico de
disfibrinogenemia*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Lidia Isabel Madrid San Martín como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. Rita Marchi

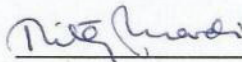
Asesor académico: Dra. Concepción Hernández

CARACAS, VENEZUELA
NOVIEMBRE - 2016

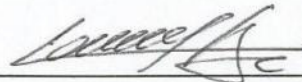
DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA BR. LIDIA ISABEL MADRID SAN MARTIN

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado titulado **“Caracterización funcional y estructural de un fibrinógeno de paciente con presunto diagnóstico de disfibrinogenemia”** presentado por la Br. Lidia Isabel Madrid San Martín, C.I. V-21.092.285, , para optar al título de Licenciado en Biología, lo consideramos APROBADO dado que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinticuatro (24) días del mes de Noviembre del año 2016.

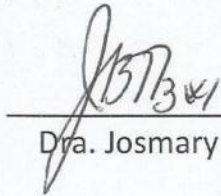


Dra. Rita Marchi
(Tutora)

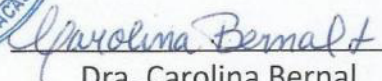


Dra. Concepción Hernández Ch.
(Asesora Académica)





Dra. Josmary Brazon



Dra. Carolina Bernal

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Hemostasia.....	1
Modelo clásico de la coagulación o cascada de la coagulación en Y	1
Modelo celular de la coagulación	4
Fibrinógeno y fibrina	6
Factores que influyen sobre la estructura de la malla de fibrina	9
Fibrinólisis	9
Disfibrinogenemia	11
ANTECEDENTES	13

OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Caso en estudio	19
Obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP)	19
Extracción de ADN.....	20
Cinética de polimerización de la fibrina en plasma	20
Determinación de la concentración de Fibrinógeno en plasma por el método gravimétrico	21
Purificación de Fg.....	21
Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	22
Estudio de la funcionalidad del Fg	22
Fibrinólisis en PPP	22
Compactación	23
Permeabilidad	23
Microscopía Confocal.....	25
Microscopía electrónica de barrido.....	26
Análisis estadísticos.....	26
RESULTADOS	28

DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	58
Anexo nº1. Modelo de consentimiento informado.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la cascada de coagulación. En este modelo están representadas las 3 vías de la coagulación: la vía intrínseca, la vía extrínseca y la vía común. Se observa la activación secuencial de los factores de coagulación (Tomado de http://saulvelazquez.blogspot.com/2013/02/vias-y-cascada-de-la-coagulacion.html , [Consulta: 02 de Octubre de 2016])	3
Figura 2. Esquema del modelo celular de la coagulación. Se representan las tres fases: Iniciación, amplificación y propagación que finalmente dan lugar a la formación del coágulo, (Tomado de http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2225/1/Sistema-de-coagulacion.html [Consulta: 24 de Febrero de 2016])	4
Figura 3. Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Cada color representa una cadena polipeptídica. Cadena γ : rosada, cadena $B\beta$: azul claro, cadena $A\alpha$: verde. El dominio central E está identificado con el color azul oscuro. La molécula fue generada usando PYMOL 1.7.4.7 PDB 3GHG.....	7
Figura 4. Esquema de la polimerización de la fibrina. (Modificado de https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm , [Consulta: 12 de Febrero de 2016]) ..	8
Figura 5. Montaje experimental del ensayo de permeabilidad. Se deben mantener 4 mL de Buffer Tris-HCl en la jeringa a lo largo de todo el experimento, estableciendo un continuo entre la misma y la columna.....	25

Figura 6. Curvas de polimerización del Fg en plasma. Al plasma sin diluir se le añade una solución de trombina - CaCl₂ (1 UI/ml y 20 mM, respectivamente, concentraciones finales) para iniciar la conversión del Fg a fibrina. Las curvas representan el promedio de tres experimentos por triplicado, con sus respectivas barras de desviación estándar.... 29

Figura 7. Electroforesis SDS- PAGE en un gel al 8% en condiciones reductoras. El Fg fue purificado por el método de β-alanina a partir de plasma control y de paciente. Carril 1. Marcadores de peso molecular (kDa). Carril 2. Fg purificado control. Carril 3. Fg purificado del paciente. Las posiciones de las cadenas Aα, Bβ y γ del Fg están señaladas. En el Fg del paciente se observa una cadena Aα de mayor peso molecular, la cual se indica como Aα' 31

Figura 8. Cinética de compactación de coágulos de plasma. Correlación entre el porcentaje de compactación y el tiempo de centrifugación. Se muestran las barras de desviación estándar 32

Figura 9. Curvas de fibrinólisis en plasma. Se coaguló el plasma con una solución de trombina - CaCl₂ (1 UI/ml y 20 mM, respectivamente, concentraciones finales), añadiendo previamente tPA (166ng), para inducir la fibrinólisis. Cada curva representa el promedio de los valores obtenidos para las diferentes muestras en tres ensayos independientes por triplicado. Se muestran las barras de desviación estándar..... 34

Figura 10. Imágenes de una red de fibrina por microscopía confocal. A) Control y B) Paciente. A simple vista puede observarse que el paciente forma una red mucho más tupida con fibras más cortas y ramificadas, con unos espacios entre las fibras mucho más pequeños en relación al control... 37

Figura 11. Imágenes de una red de fibrina obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido. A) Control; B) Paciente. Se observa que la malla de fibrina del control está compuesta por fibras más gruesas y con mayor tamaño de poros con respecto a la del paciente..... 37

Figura 12. Distribución de las fibras de fibrina en coágulos de plasma. Se midieron y agruparon 130 fibras de 8 imágenes en intervalos de 20 nm cada uno. Las columnas moradas corresponden a medidas realizadas a partir de coágulos del control y las azules a las tomadas a partir de los coágulos del paciente..... 39

Figura 13. Porosidad de la malla de fibrina por unidad de área. Resultados obtenidos a partir de las imágenes tomadas por microscopía confocal. Las barras moradas corresponden a medidas tomadas de la muestra control y las azules a las del paciente. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia, representan el valor dentro de la escala de grises (0-255). El área obtenida con los valores entre 0 y 5 UAF corresponden a los poros de la malla... 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las pruebas básicas de coagulación realizadas al paciente.....	28
Tabla 2. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de polimerización de la fibrina.	30
Tabla 3. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de compactación de la malla de fibrina.....	33
Tabla 4. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de degradación de la fibrina.	35
Tabla 5. Permeabilidad (valores de ks) de coágulos formados a partir de plasma.....	36
Tabla 6. Parámetros calculados a partir del análisis de las imágenes de microscopía..	38

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Fg:	Fibrinógeno
FT:	Factor tisular, tromboplastina tisular
FV:	Factor V, proacelerina
FVII:	Factor VII, proconvertina
FVIII:	Factor VIII, factor antihemofílico, globulina antihemofílica
FIX:	Factor IX, componente tromboplastínico del plasma
FX:	Factor X, factor Stuart-Prower
FXI:	Factor XI, antecedente tromboplastínico del plasma
FXII:	Factor XII, factor Hageman, factor contacto
FXIII:	Factor XIII, factor estabilizador de fibrina, factor Jaki-Lorand
PPP:	Plasma pobre en plaquetas
t-PA:	Activador tisular del plasminógeno
u-PA:	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos cinco años, y cuya participación directa o indirecta permitió la culminación de mi Trabajo Especial de Grado.

A mi familia, mis compañeras de laboratorio en el IVIC y amigos, por su comprensión, compañía y paciencia.

A mi tutora, la Dra. Rita Marchi. Gracias por su valiosa colaboración, por la atención y el tiempo que ha dedicado a enseñarme y formarme como investigadora, por el apoyo que me ha brindado durante el desarrollo de mi trabajo. Gracias por todas las revisiones y correcciones a este escrito.

A la Dra. Concepción Hernández. Gracias por su valiosa orientación y consejos que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Lic. Héctor Rojas, por su ayuda en la toma de imágenes de microscopía confocal y por haberme explicado la metodología que permitió su análisis cuantitativo.

Al Dr. Michael Meyer, por el análisis de ADN, sin su ayuda no habiéramos conocido la mutación del Fibrinógeno del paciente.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por permitir llevar a cabo esta investigación dentro de sus instalaciones.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por los excelentes profesores de los que tuve la oportunidad de aprender y por haber sido mi segundo hogar en estos años.

RESUMEN

Al ocurrir una lesión que afecte los vasos sanguíneos, como mecanismo de defensa del organismo, se forma una barrera estructural que evita las hemorragias. Esta barrera consiste en un coágulo insoluble de plaquetas y fibrina. La fibrina se forma a partir de fibrinógeno (Fg), glucoproteína principal de la coagulación, está constituido por tres pares de cadenas polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ y γ) y es codificado por tres genes ubicados en el cromosoma 4. A las anomalías hereditarias generadas por mutaciones en los genes que codifican para el Fg se les conoce como disfibrinogenemias congénitas. En este trabajo se realizó una caracterización funcional y estructural al Fg de un paciente con diagnóstico de disfibrinogenemia, confirmado mediante secuenciación de ADN. El Fg del paciente presentó una mutación puntual de tipo $A\alpha$: p. S434N, que genera una extraglicosilación en la cadena $A\alpha$, que incrementa las fuerzas de repulsión entre los monómeros de fibrina, perturbando la agregación lateral de las protofibrillas, lo que disminuye la velocidad de polimerización de la fibrina y reduce la turbidez final de los coágulos formados a partir de plasma. Los coágulos mostraron una alta densidad de fibras muy finas y una baja porosidad cuando fueron evaluados por microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido. Estas características estructurales le confieren a la malla un incremento en su rigidez, disminución de la permeabilidad y reducción en la velocidad de disolución de la misma. Este trabajo demuestra la utilidad del estudio de las disfibrinogenemias, ya que permite develar la relación entre la estructura y la función del Fg. Se reafirmó la importancia que tiene la región αC del Fg en la formación de la malla de fibrina, ya que se constató que una

mutación que afecte estos dominios causa impedimentos en el proceso de formación y degradación de la misma y alteraciones en la arquitectura de los coágulos.

Palabras clave: Hemostasia, coagulación, fibrinógeno, disfibrinogenemia.

INTRODUCCIÓN

Hemostasia

La hemostasia puede definirse como la interacción balanceada entre células sanguíneas y proteínas plasmáticas, la cual se activa tras haber sufrido un traumatismo o lesión. Constituye un mecanismo de defensa del organismo, que previene la pérdida de sangre y conlleva a la reparación del vaso lesionado (Kolde, 2004).

Al ocurrir una lesión en un vaso sanguíneo, se activan y adhieren las plaquetas al tejido subendotelial expuesto (rico en colágeno, fibronectina, factor von Willebrand y otras moléculas de la matriz extracelular), seguido de la agregación plaquetaria, proceso que se encuentra mediado por receptores glucoprotéicos presentes en la superficie de las plaquetas (Dalmau, 2015). Casi en simultáneo se inicia la coagulación, en donde intervienen numerosas enzimas y factores que son activados por reacciones sucesivas, llevando finalmente a la formación del coágulo de fibrina. Una vez cumplida su función de detener la extravasación de la sangre, la fibrina es degradada por el sistema fibrinolítico (Clínica Universidad de Navarra, 2015).

Modelo clásico de la coagulación: cascada de la coagulación en Y

El mecanismo clásico de la coagulación (figura 1) se ha representado mediante el modelo en cascada o Y. En este se esquematizan los distintos pasos, en donde diversas enzimas clivan

precursores enzimáticos o zimógenos, generando la siguiente enzima que interviene en el proceso (Kolde, 2004).

Según este modelo, la coagulación es descrita por dos vías diferentes: la vía extrínseca y la intrínseca, que convergen en la vía común o activación del factor X (FX) (Kolde, 2004).

La vía extrínseca se inicia en el sitio en donde ha ocurrido una lesión vascular, por la exposición del factor tisular (FT) en la superficie de las células del subendotelio o en la de los glóbulos blancos en circulación. Esta glucoproteína se une al factor VII activado, formando un complejo (FVII/FVIIa) que cataliza la transformación del FX a su estado activo (FXa), proceso que ocurre de manera más eficiente en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos (Gómez, y col. 2011).

Por otro lado, en la vía intrínseca participan los factores de coagulación: VIII, IX, X, XI y XII, siempre en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos, con proteínas como la precalicreína y el quinínogeno de alto peso molecular, quienes dan inicio a esta vía cuando, en conjunto con los factores XI y XII, entran en contacto con superficies cargadas negativamente, etapa conocida como fase de contacto. La precalicreína en presencia de cargas negativas sufre un cambio conformacional y pasa a calicreína, que activa al factor XII, el cual en su estado activo (XIIa) puede activar al FXI y a su vez, hidrolizar más precalicreína en calicreína (King, 2015).

El FXIa activa al factor IX, que en este estado (IXa) y en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} activa al FX, reacción de baja eficiencia; sin embargo, en el momento en que se forman pequeñas cantidades de trombina por la vía extrínseca, el factor VIII es activado (FVIIIa) y el complejo FX-FIXa-FVIIIa (conocido como complejo tenasa) activa al FX con una eficiencia alta, conectándose así esta vía con la vía común (King, 2015).

En la vía común, sobre una superficie fosfolipídica y en presencia de Ca^{2+} , se forma el complejo enzimático denominado protrombinasa encargado de transformar a la protrombina en trombina (Gómez, y col. 2011). Este está conformado por el FXa, el factor V activado (FVa), por la trombina y la protrombina. La trombina, es la enzima que actúa sobre el fibrinógeno (Fg), generándose así el coágulo de fibrina. Esta enzima también activa a una transglutaminasa, el factor XIII (FXIII), el cual entrecruza las moléculas de Fg (King, 2015). El entrecruzamiento de la fibrina por el FXIIIa la hace mecánicamente más estable y resistente a la lisis.

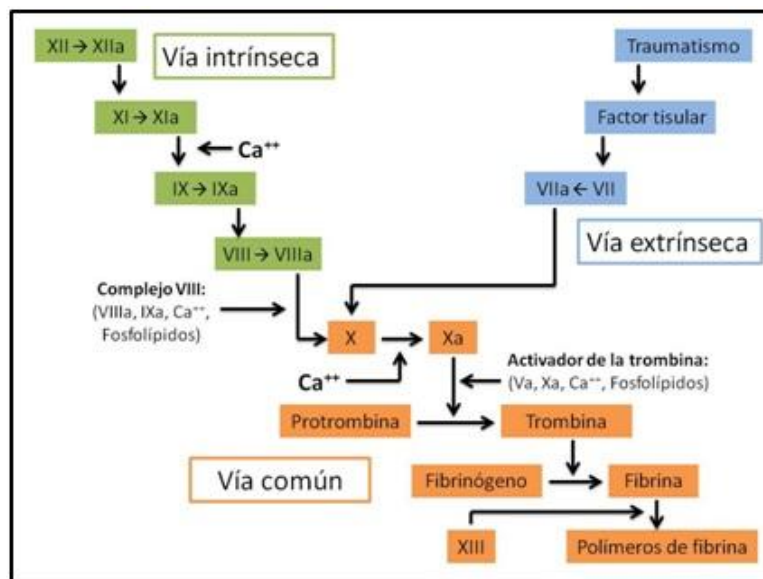


Figura 1. Esquema de la cascada de coagulación. En este modelo están representadas las 3 vías de la coagulación: la vía intrínseca, la vía extrínseca y la vía común. Se observa la activación secuencial de los factores de coagulación (Tomado de <http://saulvelazquez.blogspot.com/2013/02/vias-y-cascada-de-la-coagulacion.html>, [Consulta: 02 de Octubre de 2016])

Modelo celular de la coagulación

Más recientemente se ha propuesto el modelo celular (Hoffman, 2003), en el cual no hay separación entre vías extrínseca e intrínseca, sino que la antigua vía extrínseca es la que inicia la coagulación e integra el papel de las células (membranas fosfolipídicas con carga negativa) como sitios en donde se unen los distintos complejos proteicos para finalmente formar a la trombina, enzima que permite la formación del coágulo o malla de fibrina.

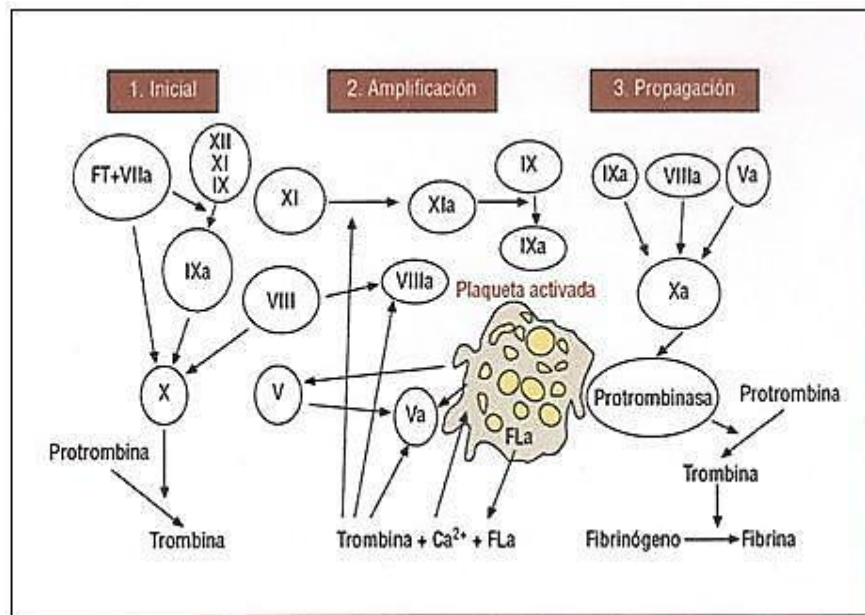


Figura 2. Esquema del modelo celular de la coagulación. Se representan las tres fases: Iniciación, amplificación y propagación que finalmente dan lugar a la formación del coágulo, (Tomado de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2225/1/Sistema-de-coagulacion.html>

[Consulta: 24 de Febrero de 2016])

De acuerdo con este modelo (figura 2), la coagulación puede dividirse en tres fases; una de iniciación, en donde se generan bajas cantidades de factores de la coagulación enzimáticamente activos, una de amplificación, en donde la concentración de los factores de la coagulación activos incrementa y una última fase de propagación, en donde estos factores se unen a las membranas de las plaquetas activadas, llevando a la formación de grandes

cantidades de trombina que dan lugar a la formación de los coágulos de fibrina (Martínez, 2006).

La fase de iniciación ocurre en la superficie de las células que expresan el FT - fibroblastos, células mono nucleares y macrófagos- que es el receptor celular y cofactor del FVII, proteína sintetizada principalmente en el hígado, de forma tal que al asociarse estos dos factores, el FVII es activado completamente, formando así el complejo FT/FVIIa, que activa pequeñas cantidades de FIX y FX, lo que permite que el FXa se asocie con su cofactor FVa (presente en circulación), activado previamente por las pequeñas cantidades de trombina generadas por el complejo FT-FVIIa-FXa, formando así un complejo protrombinasa en las células que expresan el FT, que lleva a la conversión de protrombina en trombina (King, 2015). La cantidad de trombina formada por el complejo FT-VIIa-FXa no es suficiente para inducir la formación del coágulo, ya que éste es rápidamente inhibido por el inhibidor fisiológico de la vía del factor tisular (TFPI).

Posteriormente, en la fase de amplificación, debido a la generación de estas pequeñas cantidades de trombina, ocurre la activación de plaquetas, y en paralelo, también se da la conversión de FV a FVa (liberado por los α -gránulos de las plaquetas), incrementando así, la actividad protrombinasa y la conversión de FVII a FVIIa, que actúa de la forma descrita en la fase de iniciación y la activación del FXI sobre la superficie de las plaquetas (Martínez, 2006).

La fase de propagación ocurre en la superficie de las plaquetas activadas, en donde el FIXa se une con FVIII, que activa al FX, formando el FXa que se asocia con su cofactor FVa, de forma tal que el complejo FXa/FVa produce una cantidad de trombina suficiente para la

formación de fibras de fibrina, las cuales se entrecruzan entre sí gracias al FXIIIa, permitiendo así, la formación de un coágulo estable de fibrina (Kolde, 2004).

Fibrinógeno y fibrina

El Fg es una glucoproteína plasmática de aproximadamente 45 nm de longitud y un peso de 340 kDa, que circula en el torrente sanguíneo a una concentración promedio de 2.8 g/L y posee una vida media de aproximadamente 64 a 96 horas. La principal fuente de Fg plasmático es el hígado, aunque también hay presencia de esta proteína en plaquetas, nódulos linfáticos y fluido intersticial, la cual es sintetizada en sitios extra hepáticos (Marchi, 2012).

Esta proteína es el producto de la expresión de tres genes ubicados en el cromosoma 4, cada uno de los cuales especifican la estructura primaria de los tres pares de cadenas polipeptídicas que lo conforman: A α , B β y γ , unidas entre sí por 29 puentes disulfuro (Weisel, 2005). La molécula presenta una estructura trinodular, con un nódulo central, dominio E, formado por los 6 extremos aminoterminales de las cadenas proteicas, y dos nódulos externos D, formados por los extremos carboxi-terminales de las mismas (Weisel, 2005). Entre los dominios E y D, los tres pares de cadenas polipeptídicas se enroscan formando una triple α -hélice, las cuales proporcionan flexibilidad y estabilidad mecánica a la molécula (Weisel, 2005). En la figura 3 se puede observar una representación de la molécula de Fg.

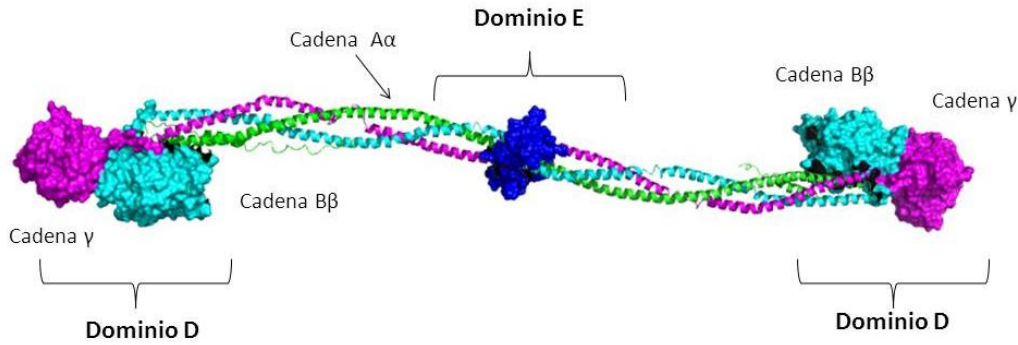


Figura 3. Esquema de la molécula de Fibrinógeno. Cada color representa una cadena polipeptídica. Cadena γ : rosada, cadena $B\beta$: azul claro, cadena $A\alpha$: verde. El dominio central E está identificado con el color azul oscuro. La molécula fue generada usando PYMOL 1.7.4.7 PDB 3GHG.

Debido a las cargas negativas presentes en los extremos amino terminales de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ del Fg, esta proteína no polimeriza espontáneamente (Marchi, 2012), sino luego de la escisión por la trombina de péptidos cortos (fibrinopéptidos A y B) localizados en el dominio E, lo cual permite que los monómeros de fibrina resultantes se asocien entre sí formando una red tridimensional de fibras ramificadas denominada malla de fibrina (Handin, 2003), proceso que se encuentra esquematizado en la figura 4. Ésta se caracteriza por su estructura espacial, el grosor y la densidad de las fibras, grado de ramificación, porosidad y elasticidad (Lauricella, 2007), las cuales pueden alterarse en pacientes con disfibrinogenemia.

La malla de fibrina es estabilizada por el factor XIII de la coagulación, activado previamente por trombina (FXIIIa), que entrecruza a las subunidades de fibrina. En una etapa temprana de formación del coágulo se entrecruzan las cadenas γ , mientras que de manera más lenta ocurre el entrecruzamiento de las cadenas α de la fibrina (Handin, 2003).

Un coágulo mecánicamente estable y resistente a proteasas es vital para prevenir la pérdida de sangre y promover la cicatrización de las heridas. Varios procesos se activan simultáneamente en respuesta a una herida vascular, con el fin de detener la extravasación de la sangre y curar el área lesionada. Como proteína reactante de fase aguda, la síntesis y secreción del Fg hepático aumentan después de la lesión tisular y la fibrina formada es la matriz extracelular temporal más importante en el área de la herida, proporcionando un andamio adecuado para la migración de leucocitos, células endoteliales y otras células durante el proceso de cicatrización (Marchi, 2012).

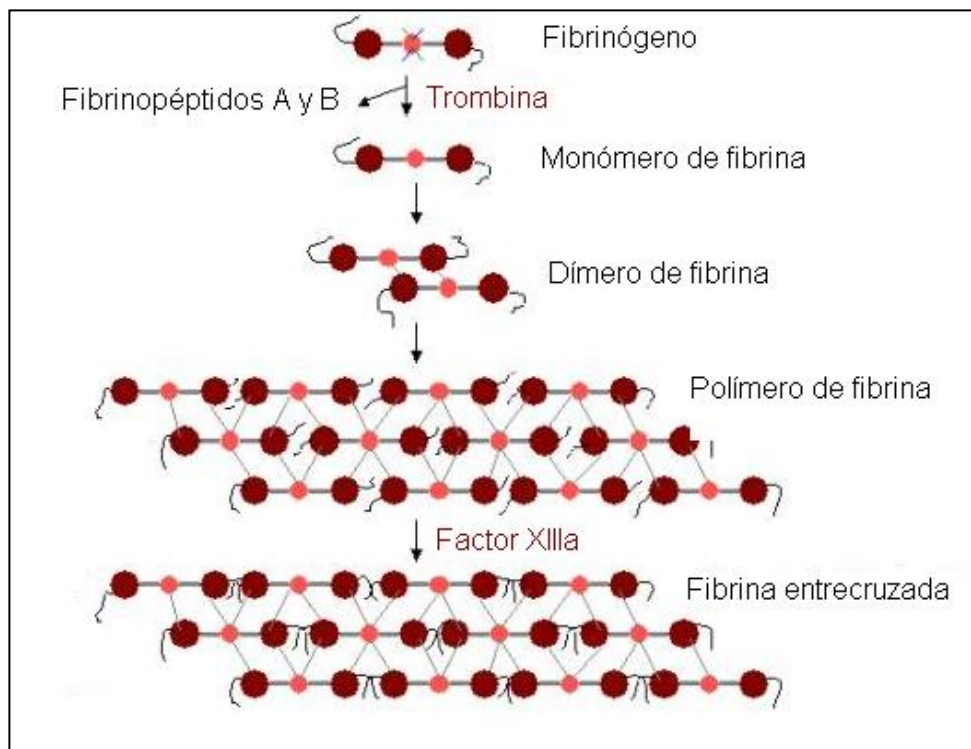


Figura 4. Esquema de la polimerización de la fibrina. (Modificado de https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm, [Consulta: 12 de Febrero de 2016])

[//www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm](https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm), [Consulta: 12 de Febrero de 2016])

Factores que influyen sobre la estructura de la malla de fibrina

La estructura de la malla de fibrina depende de un número de factores como fuerza iónica, concentraciones de trombina, Ca^{2+} y Fg.

Un incremento en la fuerza iónica genera un coágulo más ramificado y compacto, de mayor turbidez y rigidez, y con un tamaño de poro marcadamente disminuido en comparación con coágulos obtenidos bajo menor fuerza iónica (fisiológica). Además, la estructura de mallas de fibrina obtenidas a partir de Fg purificado se ve influenciada por los cationes divalentes. A concentraciones fisiológicas, los tres sitios de unión a Ca^{2+} de alta afinidad del Fg, ubicados dos en el subdominio C de la cadena γ y el otro en el dominio central E, se encuentran ocupados, de forma tal que el Ca^{2+} mantiene la estructura y la estabilidad del Fg, favoreciendo la formación de fibras más gruesas, más elásticas y con mayor resistencia mecánica (Lauricella, 2007).

La concentración de trombina influye tanto el grosor como la densidad de las fibras. Bajas concentraciones de esta enzima producen coágulos muy turbios, altamente permeables que se componen de fibras gruesas, mientras que concentraciones más altas producen coágulos menos permeables que se componen de una densa red de fibras de fibrina relativamente delgadas (Wolberg y Campbell, 2008).

En relación a la concentración de Fg, Ryan y col. (1999) reportaron que a medida que ésta incrementa, ocurre un aumento de la rigidez del coágulo, los cuales están conformados por fibras de menor grosor, que puede atribuirse a tasas aceleradas de la formación de monómeros, rápidamente entrecruzados, que inhibe el crecimiento lateral de la fibras .

Fibrinólisis

La fibrinólisis es un proceso enzimático altamente regulado por una serie de cofactores, inhibidores y receptores, que previene la acumulación innecesaria de fibrina intravascular y permite la eliminación de trombos, mediante la lisis de los coágulos de fibrina (Kolde, 2004).

La plasmina es la enzima central de la fibrinólisis, participando activamente en la degradación de las redes de fibrina y es activada *in vivo* a partir de plasminógeno, glucoproteína de cadena sencilla de aproximadamente 92kDa en humanos, con una concentración plasmática de 150 a 200mg/L, mediante la acción de dos serinoproteasas, el activador del plasminógeno tipo tisular, t-PA (Sintetizado y liberado por células endoteliales), y el tipo uroquinasa, u-PA (producido por monocitos, macrófagos, y epitelio urinario). (Chapin y Hajjar, 2014).

El u-PA el mayor activador en el espacio extravascular, asociado generalmente con acontecimientos de remodelación de tejidos debido a su participación en la degradación de la matriz extracelular y el t-PA el mayor activador en el espacio intravascular, de forma tal que la principal vía de activación del plasminógeno ocurre a través del t-PA (Longstaff, y Kolev, 2015)..

A través de la escisión del enlace peptídico Arg-Val correspondiente a Arg561-Val562 presente en el plasminógeno se genera una molécula de plasmina compuesta por dos cadenas, una liviana (A), en donde se encuentra el extremo aminoterminal, y una pesada (B), con el extremo carboxiterminal (Handin y col., 2003). Esta molécula escinde enlaces de los extremos carboxiterminales de la cadena A α y aminoterminal de la cadena B β de los monómeros de fibrina que conforman el coágulo, generando así un fragmento denominado X, el cual es posteriormente hidrolizado, generando al fragmento Y un fragmento D. La eventual

degradación del fragmento Y da origen a otro fragmento D y uno E (Longstaff, y Kolev, 2015).

En la vía de activación de la fibrinólisis mediada por u-PA, forma activa del precursor plasmático pro-uroquinasa (Kolde, 2004), luego de la activación de esta proteína por la acción del FXIIa, calicreína y plasmina, actúa sobre el plasminógeno y se forma plasmina, permitiendo de esta manera que ocurra la lisis de la fibrina. El u-PA no se une al Fg ni a la fibrina, a diferencia del t-PA que es altamente afín a esta, siendo, inclusive la fibrina un cofactor en la formación de plasmina por acción del complejo t-PA-plasminógeno, ya que en ella dos sitios están involucrados en la activación del plasminógeno, A α 148-160 y γ 312-324. Ambos son de difícil acceso en el Fg, pero quedan expuestos durante el ensamblaje de la malla de fibrina (Handin y col., 2003). El A α 148-160 une plasminógeno y t-PA, mientras que, la secuencia γ 312-324 interactúa exclusivamente con t-PA (Marchi, 2012). Durante la degradación de fibrina, se exponen residuos de lisina, los cuales unen más plasminógeno, mejorando así el rendimiento de la fibrinólisis (Longstaff, y Kolev, 2015). La arquitectura del coágulo influencia la velocidad de degradación del coágulo (fibrinólisis).

Disfibrinogenemia

A los desórdenes de la coagulación causados por anomalías estructurales en la molécula del Fg se les conoce como disfibrinogenemias y pueden ser hereditarias o adquiridas (Cunningham, y col. 2002).

Las disfibrinogenemias hereditarias son causadas por mutaciones en los genes que codifican para las cadenas A α , B β y γ del Fg. Han sido reportadas más de 300 mutaciones de esta proteína en pacientes con disfibrinogenemias, las cuales, de acuerdo al tipo y la posición de la

mutación pueden provocar distintas alteraciones del funcionamiento normal del Fg. Se han reportado mutaciones que conllevan a la formación de moléculas con cadenas truncadas, hasta la generación de nuevas secuencias consenso (Asn-X-Ser/Thr) que pueden causar extraglicosilaciones en las distintas cadenas del Fg (Koopman, 1992).

Las disfibrinogenemias son diagnosticadas mediante el hallazgo de alteraciones en los tiempos de coagulación, y se confirman por la secuenciación de los genes que codifican para el Fg. Se estudian generalmente varios miembros de la familia afectada. En cambio, las disfibrinogenemias adquiridas son causadas normalmente por daños graves al hígado o del tracto biliar, y por este motivo es diagnosticada mediante la demostración de pruebas anormales de función hepática y tras descartar disfibrinogenemia en miembros de la familia (Cunningham, y col. 2002).

Tradicionalmente, las disfibrinogenemias se diagnostican mediante pruebas de la formación del coágulo de fibrina: el tiempo de trombina y el tiempo de reptilasa (Kolde, 2004).

El tiempo de trombina es un examen diagnóstico que mide la tasa de formación del coágulo de fibrina luego de la adición de trombina a concentraciones bajas o moderadas (humana o bovina) al plasma. Las disfibrinogenemias tienden a prolongar el tiempo de trombina inhibiendo la liberación de los fibrinopéptidos A y B o la polimerización de los monómeros de fibrina. Factores como altas o bajas concentraciones de Fg pueden alterar los resultados de esta prueba, así que es necesario considerarlos al momento de realizarla (Cunningham, y col. 2002).

Un examen alternativo para evaluar la existencia de disfibrinogenemias es el tiempo de reptilasa, que permite evaluar el tiempo de polimerización de la fibrina luego de agregar

reptilasa (enzima de veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*), proteasa que es capaz de coagular al Fg, ya que escinde únicamente al fibrinopéptido A (Cunningham, y col. 2002). Al igual que con el tiempo de trombina, algunas disfibrinogenemias pueden presentar un tiempo de reptilasa prolongado debido a una liberación defectuosa o no liberación del fibrinopéptido A (Kolde, 2004).

ANTECEDENTES

El estudio de las disfibrinogenemias ha permitido correlacionar la estructura y función de la molécula de Fg con los síntomas clínicos (sangrado y/o trombótico) que pueden presentar los pacientes con estas variantes del Fg. Aunque aproximadamente el 50% de las disfibrinogenemias son asintomáticas (Ebert, 1991).

Las numerosas mutaciones que han sido identificadas en las distintas cadenas del Fg proporcionan nuevos conocimientos acerca de esta proteína, los diferentes tipos de mutaciones, frecuencias de polimorfismos, interacciones proteína—proteína, mecanismos de ensamblaje de subunidades, entre otros, que pueden complementar varios campos de investigación (Ebert, 1991). En particular se hará énfasis en las disfibrinogenemias con sustituciones de aminoácidos que generan extraglicosilaciones debido a la formación de una secuencia consenso de tipo Asn-X-Thr/Ser, ya que la mutación descrita en este trabajo genera un carbohidrato extra en la región αC de la cadena $A\alpha$ del Fg del paciente en estudio.

El Fg Asahi (Yamazumi y col., 1989), presenta una sustitución Met310Thr en la cadena γ que causa en el paciente una tendencia al sangrado de leve a moderada, debido a que la polimerización y entrecruzamiento de la malla de fibrina se ve afectada. Esta mutación da lugar a una extraglicosilación cerca de la región carboxiterminal de la cadena γ que perturba la conformación local del dominio D, la cual es crítica para la polimerización de la fibrina.

En la cadena $B\beta$ del Fg también se han documentado mutaciones, siendo una de ellas el Fg Niigata (Sugo, y col., 1999), proveniente de un paciente asintomático. Esta mutación se encontraba en condición heterocigota y presentaba dos especies de la cadena $B\beta$, denotadas

como B β y B β ', siendo B β la correspondiente a la normal mientras que B β ' poseía un peso adicional de 3000 Da más. Además de esto, la extraglicosilación introducida en esta cadena del Fg Niigata altera la asociación lateral de las protofibrillas y la agregación de las fibras por la restricción estérica de la cadena principal de hidratos de carbono y también por las cargas negativas adicionales de los residuos de ácido siálico en el extremo terminal del oligosacárido biantenarico. Sin embargo, esto aparentemente no causa ningún efecto sobre la rigidez y permeabilidad de la malla de fibrina Niigata.

Entre los ejemplos de variantes del Fg con alteraciones en la cadena A α podemos mencionar al Fg Lima (Marchi y col., 2004), el cual presenta una sustitución Arg141→Ser. Esta mutación genera una secuencia consenso que da origen a una extraglicosilación en A α Asn139, en donde el carbohidrato adicional está compuesto mayoritariamente por un oligosacárido biantenarico con dos residuos de ácido siálico. Se reportó una disminución en la tasa de ensamblaje de fibras, lo que los autores adjudicaron a una fuerte inhibición en la agregación lateral de las protofibrillas debido a un incremento en las fuerzas de repulsión por las cargas negativas extras que presentaba este Fg. Los coágulos resultantes eran casi translúcidos y estaban formados por fibras delgadas. Al realizar estudios de polimerización de la malla de fibrina, se obtuvo que la turbidez final de los coágulos formados a partir del Fg Lima era mucho menor que la del control, resultado que concordaba con la estructura de la red de fibrina visualizada por microscopía electrónica.

Otra disfibrinogenemia reportada en la cadena A α del Fg es el Caracas II, (Maekawa, 1991) detectada accidentalmente en un paciente asintomático, y al igual que el fibrinógeno estudiado en este trabajo de investigación, presenta una mutación Ser434→Asn. Maekawa y col. 1991 reportan una extraglicosilación en la región carboxiterminal de la cadena A α del Fg,

generando así dos poblaciones distintas de cadenas $A\alpha$, denominadas como $A\alpha$ (cadena normal) y $A\alpha'$, de mayor peso molecular. El carbohidrato extra presente en la cadena $A\alpha$ de este Fg, está constituido en un 81,9% por un oligosacárido biantenarico con dos residuos de ácido siálico, en un 3,9% por un oligosacárido neutro y en un 14,5% por un oligosacárido con un residuo de ácido siálico.

Previamente Dang y col. (1989) encontraron evidencias de que los residuos de ácido siálico presentes en el Fg actúan como sitios de unión a Ca^{2+} de baja afinidad, lo que causa repulsión electrostática entre los monómeros de fibrina, conllevando así a una disminución en la tasa de agregación lateral de las protofibrillas debido a que se requiere la unión de moléculas de Ca^{2+} a la proteína para que se neutralicen las cargas de los residuos de ácido siálico, por lo tanto era de esperarse que en el Fg Caracas II se vieran alteraciones en la asociación lateral de las protofibrillas, y más aún porque este Fg anormal además de poseer una cantidad de ácido siálico más alta que la normal tiene a esta extraglicosilación en el dominio αC , el cual interviene en el proceso de agregación lateral (Weisel y Medved, 2001).

A nivel ultraestructural, Woodhead, y col. (1996) reportaron que en controles, la mayoría de las moléculas del Fg tienen apariencia trinodular, con el nódulo αC próximo al nódulo E, y sólo una baja proporción presentan éste nódulo cercano al dominio D. Sin embargo, en el Fg Caracas II se encontró que una alta proporción del mismo presentó el nódulo αC localizado en unos de los nódulos D. Estos resultados sugerían que los hemi-dominios αC mutados no interactuaban entre sí formando un nódulo próximo al dominio central E del Fg.

Las fibras del Fg Caracas II formadas luego de la adición de trombina eran de apariencia más heterogéneas, menos ordenadas y presentaban un diámetro dos veces menor que las fibras del control.

Los autores afirman que la variabilidad presente entre las fibras puede deberse a la presencia de diferentes cantidades de la proteína anormal dentro de distintas regiones del coágulo, ya que es posible que las proteínas mutadas se asocien de forma más lenta que las normales.

Las imágenes de microscopía revelaron que los coágulos del Caracas II formados a partir de fibrinógeno purificado eran drásticamente distintos a los controles, encontrándose grandes canales o poros en las mallas de fibrina, lo cual fue asociado a la imposibilidad de las fibras más cortas a formar una red completa. Además, gran proporción de fibras del Caracas II tenían apariencia curva. A nivel viscoelástico, la rigidez de coágulos formados a partir del Fg Caracas II era idéntica al control, registrándose únicamente variaciones a nivel de la permeabilidad de la malla de fibrina, la cual en el Fg mutado era mayor que en los controles.

OBJETIVOS

General

Estudiar las alteraciones funcionales y estructurales de un Fg de un paciente con presunto diagnóstico de disfibrinogenemia.

Específicos

- 1) Extraer ADN a partir de una muestra de sangre de un paciente para ulterior secuenciación.
- 2) Purificar Fg a partir del plasma del paciente.
- 3) Estudiar la cinética de formación y degradación de la malla de fibrina a partir de plasma.
- 4) Evaluar las propiedades elásticas de la malla de fibrina por la técnica de compactación.
- 5) Determinar la constante de Darcy o coeficiente de permeabilidad de la malla de fibrina formada con el Fg del paciente.
- 6) Estudiar la estructura de la malla de fibrina mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caso en estudio

Niño de 9 años presenta sangrado recurrente por la nariz (epistaxis) y fue evaluado en el Banco Municipal de Sangre (BMS) del Distrito Capital por posible alteración de la Hemostasia. Se estudió también al padre y a la madre. El padre y el niño tuvieron alteración en los tiempos de protrombina y trombina, permitiendo efectuar el diagnóstico clínico de posible disfibrinogenemia.

Debido a la corta edad del propósit¹ se decidió realizar la mayoría de los estudios empleando muestras de sangre de su padre, quien también presenta la misma disfibrinogenemia.

Obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se tomaron 60mL de sangre del antebrazo del paciente (Previo a lo cual el paciente firmó un conocimiento informado, del cual se adjunta un modelo en la sección de anexos, Anexo n°1), la cual se sirvió en tubos tipo falcon con Citrato de Sodio 3.8 % (1 mL por cada 9 mL de sangre) y se centrifugaron dos veces a 2000 g por 10 min a 4 °C. Posteriormente se separó el plasma del pellet y se conservó a – 60 °C.

¹ Término con el que se designa al sujeto enfermo que es el punto de partida para el estudio familiar de dicha enfermedad (Ruiz, 2011).

Extracción de ADN

Se centrifugaron 5 mL de sangre a 179 g por 10 min en una centrífuga BeckmanMicrofuge 11 (USA), se descartó el plasma y al pellet se le agregó buffer de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0.144 M, NaHCO_3 1 mM) hasta completar un volumen de 15 mL, dejándose en agitación por 15 min, luego de los cuales se centrifugó la muestra por 10 min a 179 g, se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar el pellet a 179 g por 10 min, conservando únicamente el sedimento, al cual se le agregó nuevamente buffer de lisis de glóbulos rojos hasta completar un volumen de 15 mL, dejándose en agitación por 15 min, pasado este tiempo se volvió a centrifugar en las condiciones descritas anteriormente y se reservó el pellet. Luego, a éste se le agregó buffer de lisis de glóbulos blancos (Tris HCl 10 Mm, NaCl 0.4 M, EDTA 2 Mm, pH: 7,4) y se colocó a 50 °C por 3 horas, hasta que el pellet se disolvió. Posteriormente se agregó 1 mL de NaCl 6 M y 2 mL de cloroformo puro y se centrifugó a 280 g por 25 min. Finalmente se tomó el sobrenadante y se le agregó 1 mL de etanol a 95 %. El ADN precipitado se dejó secar en un tubo Eppendorf de 500 μL , y luego se le agregaron 500 μL de buffer Tris (Tris HCl 50 Mm, NaCl 0.15 M, pH: 7,4). (Rada, A. y Taboada, G. ,1998).

Cinética de polimerización de la fibrina en plasma

Se realizó el procedimiento descrito por Marchi (2015), agregando 100 μL de plasma y una solución trombina bovina – CaCl_2 (1UI/mL y 20 mM, concentraciones finales) a una placa de poliestireno de 96 pozos (FisherbrandTM, Fisher Scientific, USA), posteriormente se midió el cambio de absorbancia (mA) a una longitud de onda 350 nm cada 5 segundos por una hora a 37 °C usando un TECAN Infinite® 200 M. Se realizaron tres ensayos independientes por

triplicado. A cada réplica se le calculó el tiempo de latencia (s), la pendiente ($\Delta\text{mA/s}$) y turbidez final (mA).

Determinación de concentración de Fg en plasma por el método gravimétrico

A 500 μL de plasma se le agregaron 500 μL de solución trombina- Ca^{2+} (1,25 UI/mL de trombina bovina y 20 mM de CaCl_2 , concentraciones finales) y se puso a incubar en un baño a 37 °C por media hora, posteriormente se compactaron los coágulos de manera que se fijaran a una varilla aplicadora de madera. Se realizaron 3 lavados con NaCl 0,15 M y 3 con agua destilada. Luego se retiró del aplicador el coágulo, se secó con papel de filtro y se sumergió en acetona durante aproximadamente 10 min. Se puso a secar en una estufa a 37 °C hasta el día siguiente. El coágulo se pesó en una balanza analítica y se hizo una relación matemática entre el volumen de plasma inicial con el peso del coágulo, lo que permitió calcular la concentración de Fg de la siguiente manera:

$$\text{Fg} = \frac{\text{Peso del coágulo} \times 1000}{\text{Volumen del plasma inicial}}$$

Purificación de Fibrinógeno

Para obtener un plasma libre de plasminógeno, se realizó una cromatografía empleando una columna de afinidad de Lisina SepharosaTM (GE Healthcare, Suecia). Luego, el plasma eluido fue tratado de la manera descrita previamente por Jakobsen y Kierulf (1973), se le realizaron adsorciones con MgSO_4 2,46 mg/mL y con BaSO_4 90 g/1000 mL para eliminar los factores de la coagulación dependientes de vitamina K. Luego se precipitó el Fg con β -alanina 2,7 M (concentración final), repitiendo el procedimiento tres veces. Finalmente se dializó la muestra

empleando 80 volúmenes de buffer Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 por cada volumen de la solución de Fg.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se cargaron 5 µg de Fg en un gel al 8% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para electroforesis (siglas en inglés: SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron visualizadas posteriormente con azul de Coomasie R250 (Laemmli, 1970).

Estudio de la funcionalidad del Fibrinógeno

A 300 µL de Fg purificado se le agregaron 200 µL de solución trombina-Ca²⁺ (1,5 UI/mL de trombina y 5 mM de CaCl₂, concentraciones finales) y se puso a incubar en un baño a 37 °C por media hora, posteriormente se compactaron los coágulos de manera que se fijaran a una varilla aplicadora. Se realizó un lavado con agua destilada por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente se retiró el coágulo del aplicador y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un Spectronic GENESYS 6 (ThermoElectronCorporationTM) para calcular la concentración mediante la ecuación de Lambert-Beer. A partir de este valor se calculó la coagulabilidad empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Coagulabilidad} = \frac{\text{Concentración de Fg en plasma} - \text{Concentración de Fg en el sobrenadante} * 100}{\text{Concentración de Fg en plasma}}$$

Fibrinólisis en Plasma pobre en plaquetas

Se agregaron 25 µL de plasma, 75 µL de activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) (166 ng por pozo) y 25 µL de una solución trombina bovina – CaCl₂ (0.03 UI/mL y 9 mM, concentraciones finales) a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pozos, luego se midió su absorbancia a 350 nm cada 5 s por una hora y media a 37 °C usando un TECAN

Infinite® 200 M. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. A cada réplica se le calculó el tiempo de latencia (s), la velocidad de lisis (Δ mA/s), el tiempo (Lys50) en que se produce una caída del 50 % de la turbidez máxima (s) y la turbidez máxima (mA), como se describe en Carter y colaboradores (2007).

Compactación

Los coágulos fueron preparados a partir de PPP en tubos Eppendorf de 1.5 mL, previamente recubiertos con lecitina de soya disuelta en CCl_4 (Lecithin NOW. New foods. Bloomingdale) con el fin de obtener una superficie antiadherente. A 450 μL de plasma se le agregaron 50 μL de solución trombina bovina- Ca^{2+} (10 UI/mL de trombina y 20 mM de CaCl_2) y se incubaron por 4 h a 37 °C. Los coágulos se centrifugaron a 2867 g a diferentes tiempos de manera consecutiva, desde 5 hasta 180 s en una BeckmanCoulter - Microfuge™ 11. El volumen de fluido liberado de la red fue medido con una jeringa Hamilton y expresado en forma de porcentaje en relación al volumen inicial del coágulo. Se realizaron los ensayos por duplicado en tres experimentos independientes, como se describe en Nair, C. y Shats, E. (1997), con algunas modificaciones.

Permeabilidad

Se realizaron coágulos a partir de plasma con una solución de trombina bovina y CaCl_2 (1 UI/mL y 20 mmol/L, respectivamente; concentraciones finales). Luego de añadir la solución, las muestras fueron transferidas inmediatamente a columnas de plástico, grabadas en su interior con un alambre para brindar una superficie corrugada en donde se adhieran mejor los coágulos y se selló la parte inferior con Parafilm®. Las columnas fueron dejadas en una cámara húmeda por dos horas y luego se llenaron los tubos con tampón Tris-HCl (50 mM y

150 mM respectivamente, pH: 7,4) y se conectaron al montaje descrito en la figura 4, agregando buffer de manera que se establezca un flujo continuo entre la jeringa y el tubo, como se describe en Blombäck y col. (1989), con ciertas modificaciones. Se mantuvieron 4 mL de buffer en la jeringa durante toda la medición y se descartaron las primeras 6 gotas que eluyen de la columna, la séptima gota se recogió en un recipiente cuyo peso se conoce y se pesó en una balanza analítica. Se registró el tiempo de elución de la gota, y se calculó la constante de Darcy (Ks) o coeficiente de permeabilidad, que representa la superficie de gel que permite el flujo a través de una malla, y que otorga información sobre la estructura de los poros del coágulo de fibrina (Woodhead, 1996). El Ks fue calculado a partir de medidas del flujo, presión y parámetros geométricos del coágulo según la ecuación:

$$Ks \text{ cm}^2 = \frac{\Delta Q * L * n}{\Delta P * A}$$

En donde:

- L= Longitud del coágulo
- A= Área transversal de la columna de plástico
- n= Viscosidad del agua a 22°C
- ΔP = Presión hidrostática
- ΔQ = Flujo

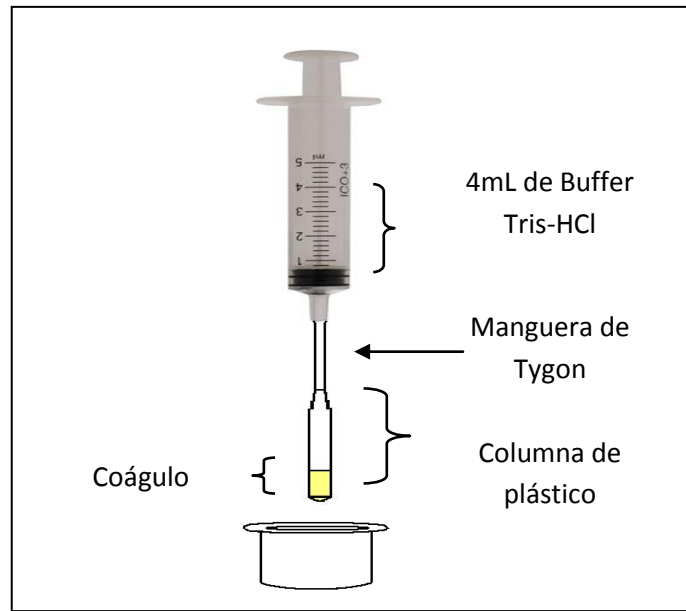


Figura 5. Montaje experimental del ensayo de permeabilidad. Se deben mantener 4 mL de Buffer Tris-HCl en la jeringa a lo largo de todo el experimento, estableciendo un continuo entre la misma y la columna.

Microscopía Confocal

En un tubo Eppendorf se mezclaron 300 μL de plasma, 5 μL de AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Oregon, USA) acoplado a Fg (proceso realizado en el laboratorio), y 10 μL de una solución trombina bovina- Ca^{2+} (0.3UI/mL de trombina y 20mM de CaCl_2 , concentraciones finales). La mezcla fue transferida a una cámara de confocal ThermoScientific™ Nunc™ Lab-Tek™, que se colocó en una cámara húmeda por dos horas a 37 °C. Estos coágulos fueron visualizados con un Microscopio OlympusConfocalFluoView™ FV100.

Posteriormente, a partir de 5 imágenes se calculó la densidad y la porosidad de la malla mediante el software ImageJ. Este programa brinda un histograma que muestra la distribución de color (en unidades arbitrarias de fluorescencia, uAF) de los píxeles de la imagen, aquellos que presentaron una fluorescencia de entre 0 y 5 (en la escala de grises), se asumieron como

poros, ya que en ellos no se encontraron fibras asociadas a moléculas de AlexaFluor 488 que emitieran fluorescencia. A partir de estos valores se expresó el área de la malla de fibrina ocupada por poros en porcentaje.

Microscopía electrónica de barrido

Se realizaron coágulos a partir de plasma agregando una solución de trombina bovina y CaCl_2 (0,3 UI/mL y 20 mmol/L, respectivamente). Luego de añadir la solución, las muestras fueron transferidas inmediatamente a tubos plásticos, tratados mecánicamente para brindar una superficie corrugada en donde se adhieran mejor los coágulos y con la parte inferior de ellos cubiertos con parafilm. Las columnas se dejaron en una cámara húmeda por dos horas y luego se limpiaron los coágulos haciendo pasar buffer cacodilato-HCl (4 mM Cacodilato de Sodio y 0,2 mM HCl, concentraciones finales), tres veces el volumen de los coágulos. Finalmente se fijaron los coágulos con glutaraldehído al 2 % (SIGMA-ALDRICH) y se lavaron nuevamente con el buffer cacodilato. Luego, se deshidrataron los coágulos con etanol, en una dilución seriada de 30 al 100 %, secados con HMDS (Hexametildisilazano), colocándolos primero en una solución 50 % HMDS-etanol por 15 min., y luego en 100 % HMDS por 20 min. Finalmente fueron cubiertos con oro-paladio, para posteriormente ser visualizados en un microscopio electrónico de barrido ambiental (eSEM-FEI Quanta 250). Se tomaron 5 imágenes obtenidas en este ensayo para calcular el diámetro de las fibras (Se midieron 130 fibras por foto) y de los poros (Se midieron 100 poros por foto).

Análisis estadísticos

Las diferencias de medias fueron evaluadas mediante pruebas de t de Student para muestras independientes, con un nivel de significación menor o igual a 0,05. Para el ensayo de

polimerización se realizó un ANOVA de un solo factor con un nivel de significación menor o igual a 0,05 y en aquellas que presentaron medias distintas se aplicó el método post hoc de Tukey.

RESULTADOS

Caso Clínico

Niño de 9 años de edad asistió al Banco Municipal de Sangre (BMS) por presentar sangrado recurrente por la nariz (epistaxis) y fue remitido al laboratorio de Biología del Desarrollo de la Hemostasia (BDH) por presunta disfibrinogenemia para confirmar diagnóstico funcional y molecular. Se encontró que los tiempos de trombina y protrombina estaban prolongados (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las pruebas básicas de coagulación realizadas al paciente.

	Control	Hijo	Padre	Valores de referencia
Tiempo de protrombina (s)*	-----	14.04	19.7	11 - 13.5
Tiempo de trombina (s)*	18.1	21	21.7	15.3 - 18.5
Fg concentración (Clauss) (mg/mL)*	-----	2.33	3.08	2.33 – 4.96
Fg concentración (Gravimétrico) (mg/mL)	3.24	3.00	2.58	2.33 – 4.96

Nota. (*) Test de coagulación realizados en el Banco Municipal de Sangre

En el BDH se estudió al paciente y sus padres, encontrando que el papá presentaba la misma alteración funcional del Fg. Se descartó que se tratara de una hipofibrinogenemia o hipodisfibrinogenemia debido a la normalidad de la concentración funcional del Fg en plasma. Las muestras de ADN fueron enviadas al Dr. Michael Meyer en la Universidad de Ciencias Aplicadas, Departamento de Ingeniería Médica y Biotecnología en Jena, Alemania

para la secuenciación de los genes que codifican al Fg (*FGA*, *FGG* y *FGB*), empleando la metodología descrita en Marchi y col. 2013. El análisis de ADN reveló una mutación puntual en el gen que codifica para la cadena A α del mismo (A α : p. S434N) en forma heterocigota.

Polimerización de la fibrina a partir de Fg plasmático

Las polimerizaciones de la fibrina de los pacientes (propositus y padre) empleando plasma fresco se diferenciaron con respecto al control en casi todos los parámetros evaluados, siendo la turbidez final del paciente 22% menor en relación al control, y la velocidad de formación de la red de fibrina (pendiente) casi 3 veces menor. Además, los coágulos de las muestras evaluadas en este estudio alcanzaron un plateau a los 600 segundos aproximadamente (Figura 6) (Tabla 2).

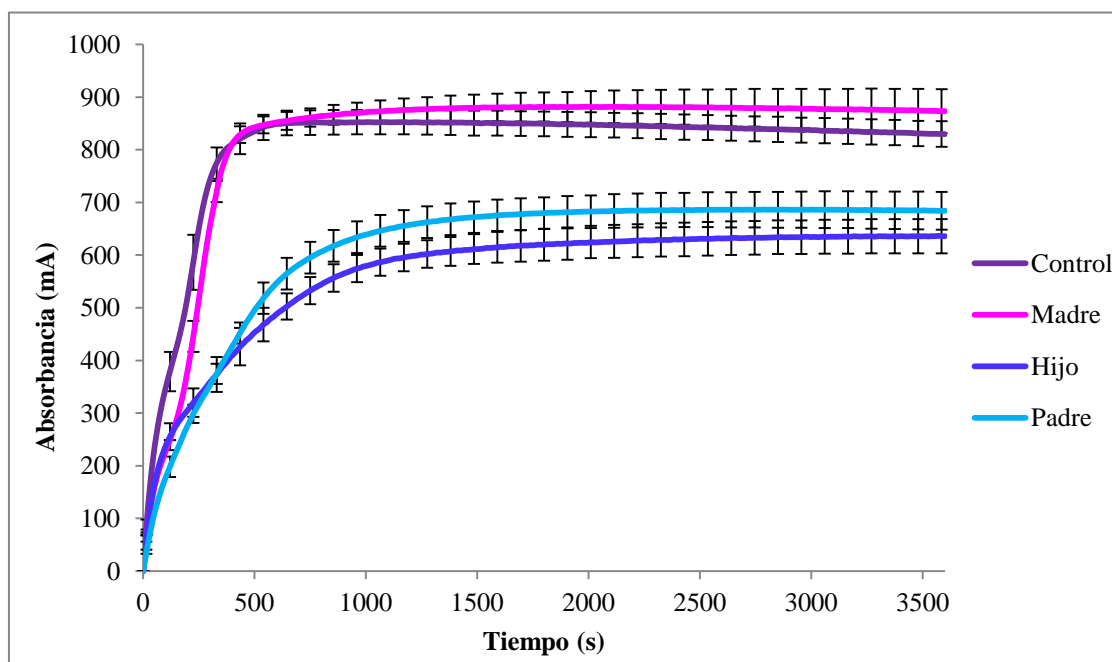


Figura 6. Curvas de polimerización del Fg en plasma. Las curvas representan el promedio de tres experimentos por triplicado, con sus respectivas barras de desviación estándar.

Tabla 2. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de polimerización de la fibrina.

	Control (n=6)	Madre (n=6)	Padre (n=6)	Hijo (n=4)
Fase de latencia	0	0	0	0
Pendiente (mA/s)	2,23 ± 0,23	2,01 ± 0,09	0,89* ± 0,19	0,78* ± 0,17
Turbidez final (mA)	873,25 ± 41,97	829,60 ± 59,18	681,10* ± 87,43	635,80* ± 80,07
TTM(s)	1320,02 ± 224,69	1695,08 ± 418,96	3090,10* ± 294,07	3300,10* ± 121,88

Nota. Los resultados de turbidez final son expresados como media aritmética ± desviación estándar.

TTM: Tiempo en alcanzar la turbidez máxima. El número de mediciones incluidas en cada grupo (n) se muestra entre paréntesis. *Diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$ con respecto al control. mA: Unidades de mili absorbancia.

Purificación del Fg

El Fg purificado fue analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Se observó que la proteína del paciente presentaba una cadena A α de mayor peso molecular comparado con el Fg control, lo que indicó que el defecto molecular se hallaba en esta cadena (Figura 7), lo cual fue confirmado con los resultados del análisis de ADN. La funcionalidad del Fg purificado del paciente fue del 91,5 % similar a la del control (92%).

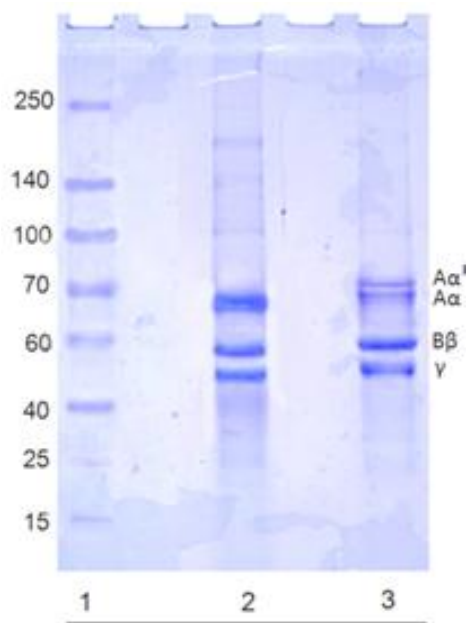


Figura 7. Electroforesis SDS- PAGE en un gel al 8% en condiciones reductoras. Carril 1.

Marcadores de peso molecular (kDa). Carril 2. Fg purificado control. Carril 3. Fg purificado del paciente. Las posiciones de las cadenas $A\alpha$, $B\beta$ y γ del Fg están señaladas. En el Fg del paciente se observa una cadena $A\alpha$ de mayor peso molecular, la cual se indica como $A\alpha'$.

Compactación

A partir del experimento de compactación (Figura 8), se pudo evaluar el comportamiento elástico de la malla de fibrina en expeler el líquido ubicado entre las fibras bajo una fuerza centrífuga. Este experimento permite estudiar la susceptibilidad de los coágulos ante una deformación irreversible debido a que se ha encontrado que la compactación es inversamente proporcional al módulo elástico de Young (Nair y Shats, 1997). El coágulo del paciente compactó aproximadamente 20% menos con respecto al control (Tabla 3), lo cual indica que el paciente forma una malla de fibrina más rígida en comparación con el control. Además, los coágulos del paciente compactaron más lentamente que los del control, alcanzando el T50

(tiempo en el cual se alcanza la mitad del valor de la compactación final) a los 55s, el doble del T50 del control. Sólo los coágulos del control alcanzaron un plateau a los 100s aproximadamente.

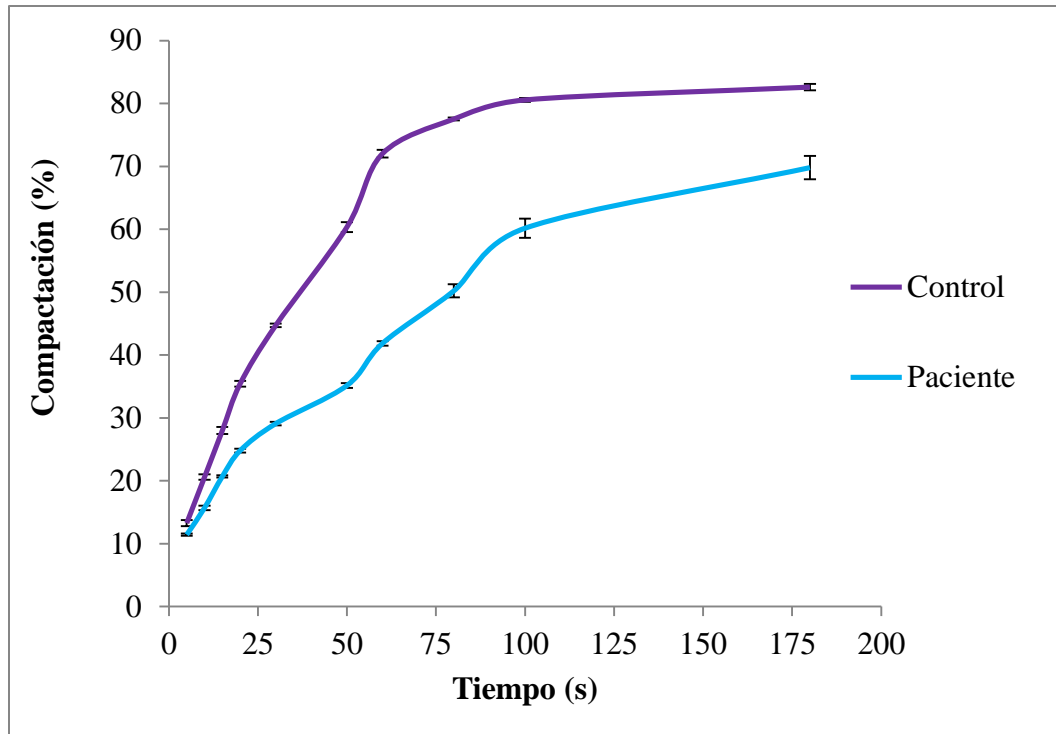


Figura 8. Cinética de compactación de coágulos de plasma. Correlación entre el porcentaje de compactación y el tiempo de centrifugación. Se muestran las barras de desviación estándar. N=3 por cada muestra

Otra característica viscoelástica a resaltar de los coágulos del paciente es que éstos eran friables, es decir se fragmentaban al tratar de envolverlo en un aplicador de madera (Alonso, 2004).

Tabla 3. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de compactación de la malla de fibrina

	Control (n=5)	Paciente (n=6)
Pendiente (%/s)	1,46 ± 0,32	0,85* ± 0,13
T50 (s)	25 ± 0	55* ± 0
Compactación final (%)	82,60 ± 0,52	69,80* ± 1,85

Nota. Los resultados de compactación final son expresados como media aritmética ± desviación estándar. El número de mediciones incluidas en cada grupo (n) se muestra entre paréntesis.

*Diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$ con respecto al control. T50: Tiempo en el cual se alcanza la mitad del valor de la compactación final.

Fibrinólisis de la malla de fibrina formada a partir de plasma

En el proceso de disolución de la malla de fibrina se registró una marcada diferencia entre el paciente y el control, en todos los parámetros de degradación cuantificados (Figura 9).

Tanto la velocidad de lisis, medida en la parte descendente de la curva, como la turbidez máxima del control fue 4 veces mayor con respecto a los valores del paciente. Por otra parte, en el paciente la Lys50 se alcanzó a los 2947,5 s, casi el doble de tiempo que le llevó al coágulo del control disminuir en 50% la turbidez máxima (Tabla 4).

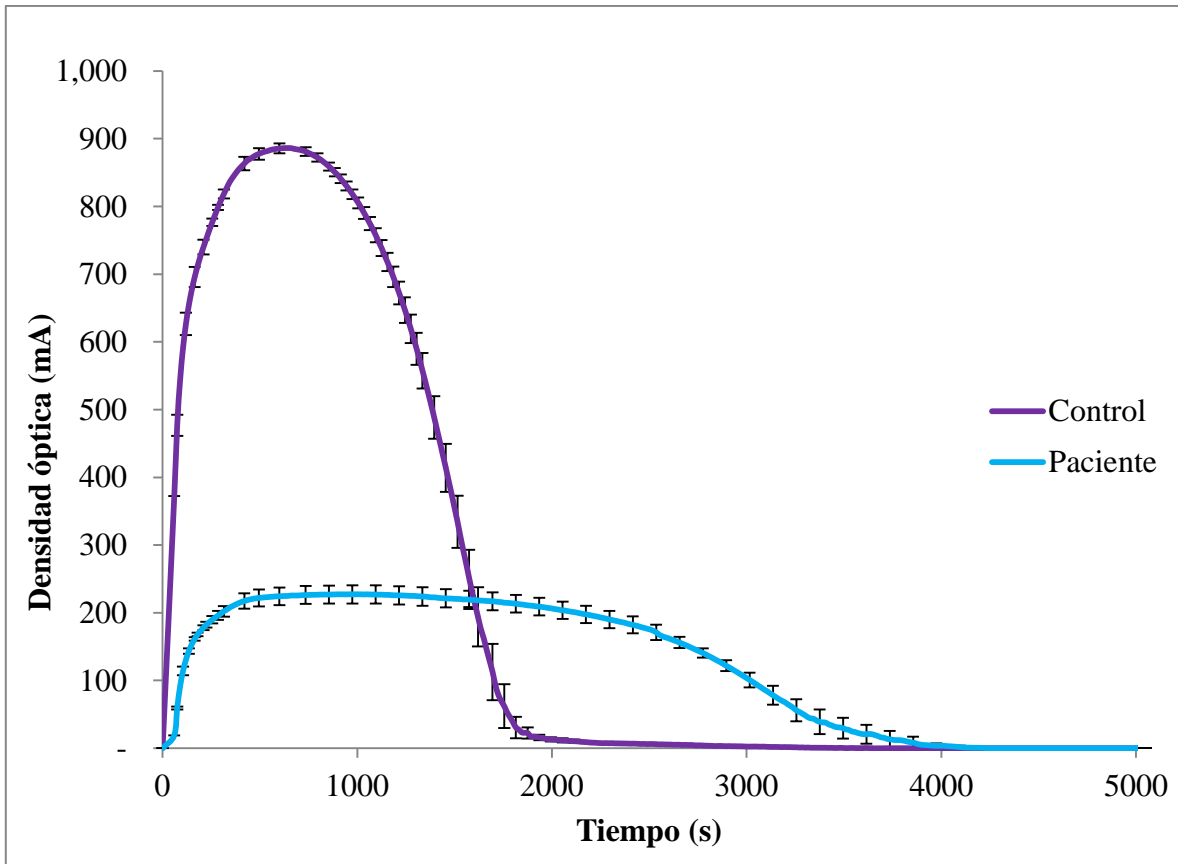


Figura 9. Curvas de fibrinólisis en plasma. Cada curva representa el promedio de los valores obtenidos para las diferentes muestras en tres ensayos independientes por triplicado. Se muestran las barras de desviación estándar.

Tabla 4. Resumen de los parámetros cuantificados del proceso de degradación de la fibrina.

	Control (n=4)	Paciente (n=4)
Fg (mg/mL)	3,54	3,00
Fase de latencia	0	0
VL (mA/s)	-1,20 ± 0,39	-0,22* ± 0,10
Lys50 (s)	1436,25 ± 56,62	2977,58* ± 160,14
Turbidez máxima (mA)	886 ± 14	227* ± 96

Nota. Los resultados de turbidez final son expresados como media aritmética ± desviación estándar. El número de mediciones incluidas en cada grupo (n) se muestra entre paréntesis. *Diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ con respecto al control. mA: Unidades de mili absorbancia. Lys50: Tiempo en que se produjo una caída del 50% de la turbidez máxima. VL: Velocidad de lisis. Se mide la pendiente en la parte descendente de la curva. El valor negativo indica que la DO disminuye en función del tiempo.

Permeabilidad de la malla de fibrina

Se observó que el coeficiente de permeabilidad (constante de Darcy, K_s) de los coágulos formados a partir de plasma del paciente fue aproximadamente 3 veces menor con respecto al control (Tabla 5). Estos valores indican que para el mismo volumen de coágulo, en el paciente, la superficie del coágulo accesible al paso de fluido fue menor.

Tabla 5. Permeabilidad (Ks) de coágulos formados a partir de plasma.

	Control (n=32)	Paciente (n=30)
Fg (mg/mL)	3,54	3,00
Ks (10^{-9} cm^2)	$5,59 \pm 0,77$	$2,03^* \pm 0,31$

Nota. Los resultados de ks son expresados como media aritmética \pm desviación estándar. El número de mediciones incluidas en cada grupo (n) se muestra entre paréntesis. *Diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ con respecto al control. Ks: Constante de Darcy

Estructura de la malla de fibrina por microscopía confocal y electrónica de barrido

Los coágulos formados a partir del plasma del paciente presentaron una estructura diferente a los del control, tanto por microscopía confocal (Figura 10) como por microscopía electrónica de barrido (Figura 11).

En los coágulos formados a partir del plasma del paciente, se observaron unas regiones muy densas de fibras, perdiendo la distribución homogénea que se observó en el control. La malla de fibrina del paciente está constituida por fibras delgadas, poros de menor tamaño y densidad de fibras mayor en comparación a la malla de fibrina del control (Tabla 6).

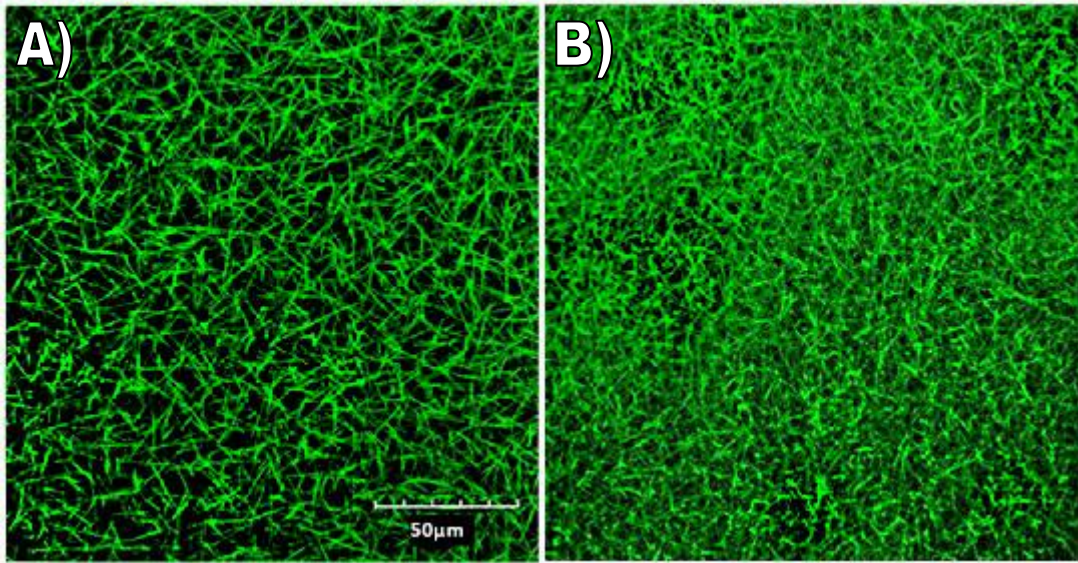


Figura 10. Imágenes de una red de fibrina por microscopía confocal. A) Control y B) Paciente. A simple vista puede observarse que el paciente forma una red tupida con fibras cortas y ramificadas, con unos espacios entre las fibras pequeños en comparación con el control.

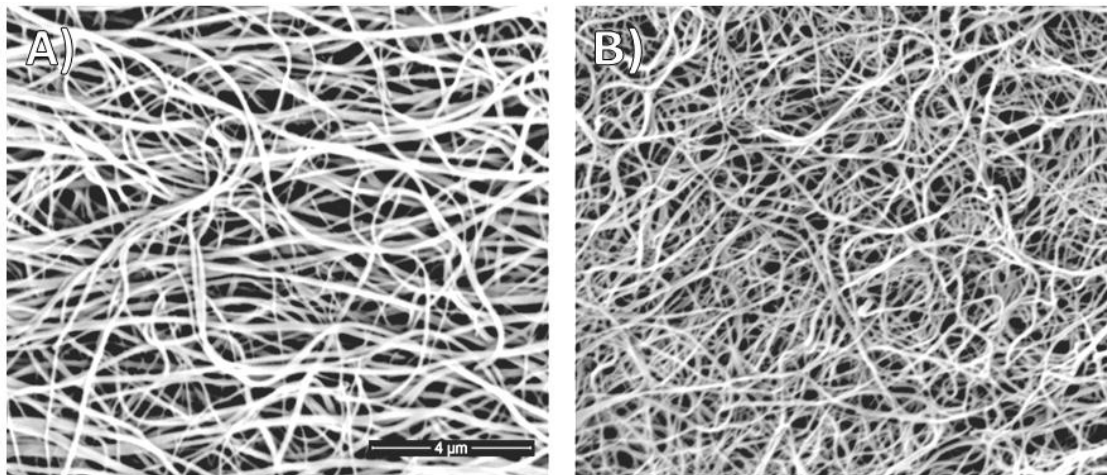


Figura 11. Imágenes de una red de fibrina obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido. A) Control; B) Paciente. Se observa que la malla de fibrina del control está compuesta por fibras gruesas y con un poros grandes.

Tabla 6. Parámetros calculados a partir del análisis de las imágenes de microscopía

	Control	Paciente
Densidad de Fibras (fibras/nm²)	10483 ± 390	14323 ± 608*
Diámetro de Fibras (nm)	132,89 ± 46,62	81,92* ± 24,83
Diámetro de poros (nm)	281,22 ± 117,47	204,37* ± 75,27
Porosidad de la malla (%)	49,04	15,23*

Nota. Los valores se reportan como media aritmética ± desviación estándar. *Diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$ con respecto al control.

Se realizó un histograma de la distribución de los diámetros de las fibras de fibrina medidos en las imágenes digitalizadas por microscopía electrónica de barrido (Figura 12). Se observa que existe una mayor población de fibras delgadas (menores a 125 nm de diámetro) en el paciente, que además presenta fibras con un grosor máximo de 185 nm, mientras que en el control la mayoría de fibras presentan diámetros comprendidos entre 105 y 165 nm y algunas llegaron a medir hasta 245 nm.

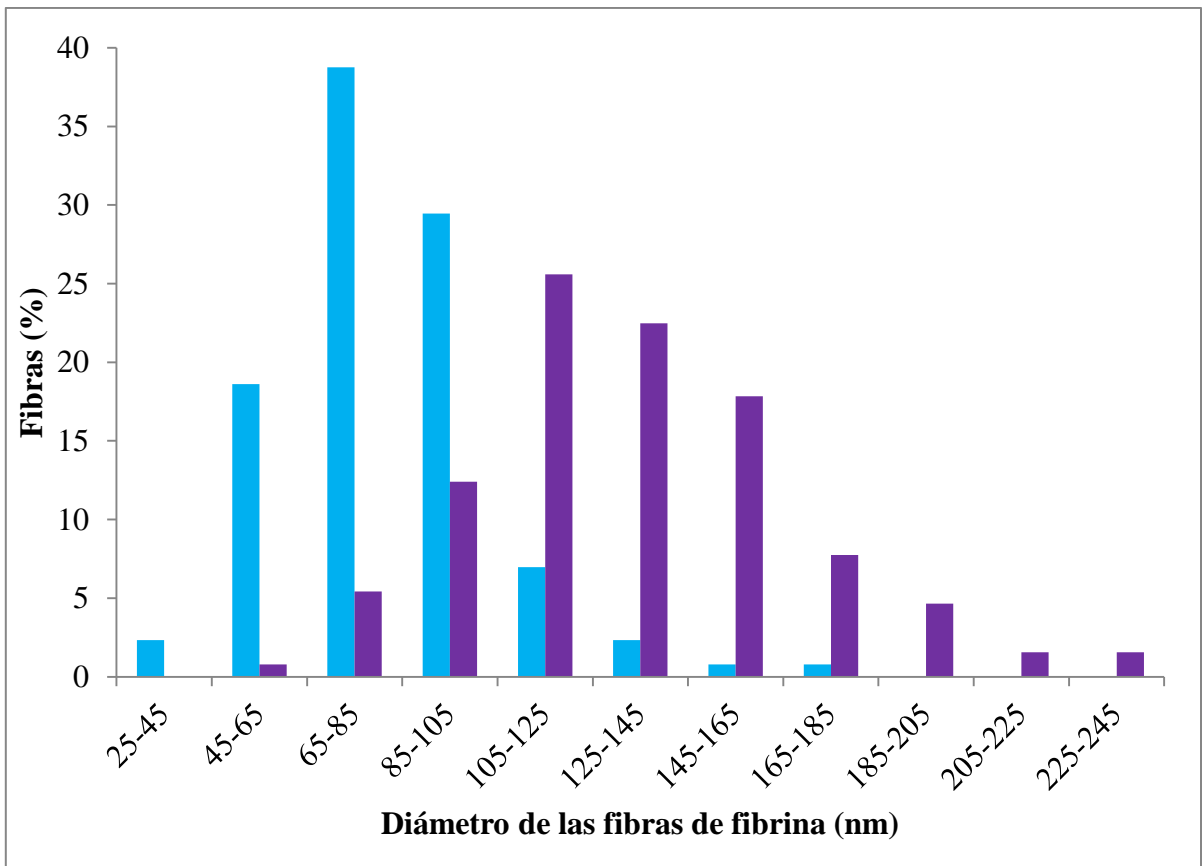


Figura 12. Distribución de las fibras de fibrina en coágulos de plasma. Se midieron y agruparon 130 fibras de 8 imágenes en intervalos de 20 nm cada uno. Las columnas moradas corresponden a medidas realizadas a partir de coágulos del control y las azules a las tomadas a partir de los coágulos del paciente.

En el histograma de la figura 13 se muestra la porosidad de la malla por área del coágulo, tomando en cuenta que aquellos valores de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) muy bajos (entre 0 y 5) son aquellos en los que no había fibras, por lo tanto por definición en este trabajo, se corresponden a los poros de la malla. Se observa claramente que en el paciente el área del coágulo que se encuentra constituida por poros es tres veces menor con respecto a la del control.

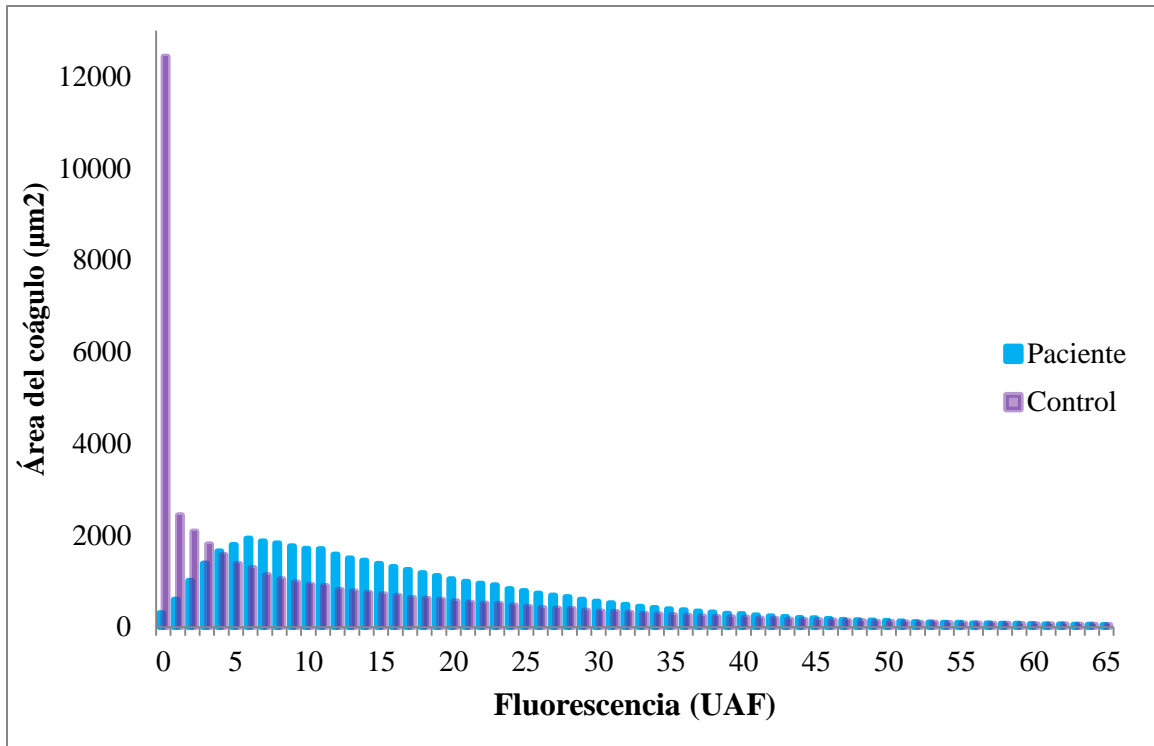


Figura 13. Porosidad de la malla de fibrina por unidad de área. Resultados obtenidos a partir de las imágenes tomadas por microscopía confocal. Las barras moradas corresponden a medidas tomadas de la muestra control y las azules a las del paciente. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia, representan el valor dentro de la escala de grises (0-255). El área obtenida con los valores entre 0 y 5 UAF corresponden a los poros de la malla.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó el Fg de un paciente con presunto diagnóstico de disfibrinogenemia debido a que los exámenes de rutina coagulación: tiempo de trombina y protrombina estaban prologados (Tabla 1). La secuenciación de los genes que codifican a esta proteína (*FGA*, *FGG* y *FGB*), reveló una mutación puntual en la cadena A α del Fg (A α : p. S434N) en forma heterocigota en el propósitus y su padre. Esta mutación ha sido reportada previamente por Maekawa y col (1991) como Fg Caracas II. El residuo S434 se encuentra dentro de los dominios α C (residuos A α 220-610) de la molécula, los cuales han sido descritos previamente como apéndices globulares que interactúan entre sí y a su vez con la región central (Dominio E) del Fg (Doolittle, 1973). El dominio α C juega un papel importante durante el proceso de agregación lateral de las protofibrillas para la formación de las fibras de fibrina. Durante la formación de la malla de fibrina ocurre un cambio conformacional en la molécula que lleva a la disociación de los dominios α C del dominio E y estos forman asociaciones intermoleculares entre las protofibrillas, lo cual finalmente conduce a la formación de la red de fibrina (Weisel, 2001).

La sustitución S434N de la cadena A α está ubicada antes de cuatro treoninas consecutivas (Chung y col. 1990), generando así una secuencia consenso para glucosilación de tipo Asn-X-Thr que ocasiona una extraglicosilación en la cadena mutada, lo cual se evidenció al evaluar el gel de electroforesis SDS-PAGE (Figura 7) y observar la presencia de la cadena designada como A α ' de mayor peso molecular que la cadena A α normal.

Cuando se estudió el proceso de polimerización del Fg del Propósitus se encontró que la velocidad de formación de la malla de fibrina fue aproximadamente tres veces menor en relación al control (Tabla 2 y figura 6). La polimerización de la malla de fibrina de la madre no presentó diferencias significativas en relación al control, debido a que la anomalía del fibrinógeno fue heredada del padre, lo cual se evidencia al observar el comportamiento casi idéntico de las curvas de polimerización entre padre e hijo.

Se presume que el carbohidrato extra presente en la cadena αA del Fg del paciente causa un incremento en las fuerzas de repulsión entre los monómeros de fibrina, perturbando la agregación lateral de las protofibrillas, lo que conlleva a una disminución en la velocidad de formación de la malla de fibrina y a una reducción del 22% en la densidad óptica final.

Carr y Hermans (1978) encontraron que la densidad óptica es proporcional al diámetro de las fibras, por lo cual se deduce que los coágulos formados a partir de plasma del paciente están constituidos por fibras más finas que los del control.

Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente por Maekawa y col. (1991), en donde se observó que la agregación de los monómeros de fibrina del Fg Caracas II ocurría a menor velocidad que los del control. Los autores de este trabajo realizaron un análisis de los oligosacáridos presentes en el Fg Caracas II mediante HPLC y obtuvieron que los carbohidratos del mismo estaban conformados en un 81,9% por un oligosacárido disializado biantenarico, en un 14,5% por un oligosacárido monosializado y en un 3,9% por un oligosacárido neutro, a diferencia de los Fg normales que tienen como componente mayoritario a un oligosacárido monosializado representando un 62,5%, uno neutro en un 15,1% y un oligosacárido disializado en un 22,4%. Estos datos apoyan la hipótesis de que

existe repulsión entre los monómeros de fibrina debido al alto contenido de ácido siálico que otorga el oligosacárido extra presente en este Fg anormal.

En las imágenes de los coágulos por microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal (Figura 10 y 11) se observó claramente que las fibras del paciente fueron casi dos veces más delgadas que el control (Tabla 6). Como ya se ha señalado, esto puede atribuirse a la disminución en la tasa de asociación lateral de los monómeros de fibrina anormales, que impide en cierto grado la asociación de las protofibrillas generadas durante el proceso de formación de la malla de fibrina. Esto se ve reflejado claramente en la Figura 12, en donde hay un desplazamiento hacia la izquierda del histograma de la distribución de los diámetros de las fibras de fibrina del paciente en relación al control.

En promedio se obtuvo que las fibras del paciente medían 81,92 nm de diámetro, mucho menos que las del control, de diámetro promedio de 132,98 nm, resultados que coinciden con Marchi y col. (1990) en el estudio por microscopía electrónica que le realizaron a los coágulos formados a partir de Fg del Caracas II, en donde se obtuvo que las fibras que conformaban la malla de fibrina de este Fg anormal tenían un diámetro aproximado entre 72 nm y 92 nm, pero varían en relación a los reportados por Woodhead y col. (1996), que consiguieron que el diámetro de las fibras de los coágulos del Caracas II era de 42 nm y las del control de 82 nm, valores que aunque difieren en magnitud con los reportados en este trabajo, al calcular la relación entre el diámetro de las fibras del Caracas II y las del control, se obtiene que al igual que en este trabajo, las fibras del control son el doble de gruesas que las del Fg anormal.

Un análisis similar fue realizado por Marchi y col. (2004) en donde se realizó la caracterización de la forma homocigota y heterocigota del Fg Lima, con una mutación A α : Arg141 \rightarrow Ser, que genera un carbohidrato adicional en la región de hélice súper enrollada de la cadena A α del Fg, causando alteraciones en la estructura de la malla de fibrina. Se observó por microscopía electrónica de barrido que los coágulos formados por la forma homocigota del Fg Lima estaban conformados por fibras más delgadas y presentaban una mayor densidad de fibras que los controles e inclusive que los coágulos realizados a partir del Fg Lima en forma heterocigota. Este presenta una estructura similar al control, indicando así que la proporción de cadenas A α normales corregía parcialmente las alteraciones funcionales y estructurales introducidas por la mutación.

Mediante las imágenes de microscopía (tanto electrónica como confocal) también se pudo observar que la densidad de fibras del paciente (14323 nm \pm 608 nm) es mayor que en el control (10483 nm \pm 390 nm), al igual que en otras disfibrinogenemias con sustituciones de aminoácidos en la región α C reportadas previamente, como el Lima (Marchi, 2003), el Caravas V (Marchi y col., 2000) y el Dusart (Koopman y col. 1993). Estos resultados difieren con los reportados en la literatura para el Caracas II (Woodhead, 1996), en donde la densidad de fibras de la red formada con el Fg anormal era menor que la del control, a pesar de tener la misma mutación que la del paciente de este estudio, lo cual puede atribuirse a la presencia de diferentes polimorfismos (los cuales no han sido evaluados en el presente trabajo ni en la literatura publicada) o a diferencias a nivel experimental ya que en el trabajo realizado por Woodhead y col. (1996) los coágulos evaluados mediante microscopía electrónica de barrido fueron formados a partir de Fg purificado. Previamente han sido reportadas diferencias en los resultados obtenidos en coágulos formados a partir de

plasma y de Fg purificado en un mismo paciente con disfibrinogenemia. Según el tipo de purificación empleado es posible que exista pérdida de una parte de las moléculas anormales, disminuyendo así la proporción de moléculas mutadas (Marchi y col. 2004). Es por esta razón que emplear coágulos formados a partir de plasma puede resultar más informativo, ya que permite un acercamiento bastante próximo al estado fisiológico en el que naturalmente se encuentra el Fg, pero sin los componentes celulares de la sangre y sin las posibles complicaciones que puede generar el proceso de purificación.

La diferencia en la densidad de las fibras de los coágulos del paciente y del control se puede asociar con la disminución de la tasa de agregación lateral, ya que al haber impedimento en la unión de protofibrillas, incrementa el número de fibras de menor diámetro dentro de la malla de fibrina, a pesar de que la concentración de Fg en el paciente y en el control es prácticamente la misma y se encuentra dentro del rango normal (Tabla 1)

Este incremento en la densidad de las fibras en los coágulos del paciente afecta la porosidad de la malla, la cual en el paciente se encuentra reducida aproximadamente en un 30% en comparación con el control (Tabla 6), lo que se puede observar cualitativamente en las imágenes de microscopía (Figura 10 y 11). Se diseñó una manera de medir la porosidad mediante la cuantificación de los espacios vacíos de la red de fibrina (descrito en la sección de metodología), los cuales corresponden a los poros de la malla, y en el histograma de la Figura 13, se puede ver claramente que en el paciente hay una menor área ocupada por poros (Tabla 6).

El efecto de los dominios α C sobre la arquitectura de la malla de fibrina ha sido estudiado previamente. Collet y col. (2005) trabajaron con un Fg recombinante que carecía de los

dominios αC , al estar truncado en la cadena α hasta el residuo 251 ($A\alpha 251$). Encontraron que los coágulos formados con esta variante del Fg estaban compuestos por fibras delgadas y presentaban una mayor densidad de fibras en comparación con un Fg con la cadena $A\alpha$ no truncada, lo cual concordaba con la baja permeabilidad que presentaba la malla de fibrina de este Fg $A\alpha 251$. Resultado similar al obtenido en este trabajo: alta densidad de fibras y baja porosidad (Tabla 6), lo cual contribuye a que haya un menor paso de fluidos por unidad de tiempo a través de la malla (K_s del paciente fue aproximadamente tres veces menor con respecto al del control), siendo la superficie disponible para la perfusión menor (Rosser, Roberts y Ferry, 1977).

Que los coágulos del paciente sean mucho menos permeables a fluidos que el control, pudiera implicar que *in vivo* el paciente presente una difusión más lenta de los componentes fibrinolíticos a través de la malla de fibrina, situación similar a la que se presenta en el Fg Dusart (Collet y col. 1996), en donde ocurre una mutación distinta en el dominio αC , que produce una red uniforme y extremadamente densa compuesta por fibras muy finas, mucho más rígida y menos permeable que la de los coágulos control, factor que según los autores contribuye a que los sujetos que poseen la mutación del Fg Dusart son propensos a desarrollar tromboembolias.

La permeabilidad es un factor relevante al momento de evaluar las posibles consecuencias clínicas de las disfibrinogenemias, puesto que juega un papel importante en la inflamación y la trombosis. El transporte de macromoléculas a través de la malla de fibrina viene mediado por procesos de difusión y convección (Gelder, Nair y Dhall, 1995). El transporte de agentes fibrinolíticos se ve alterado en redes de fibrina con permeabilidad reducida, y como en la fibrinólisis es requerida la interacción de diferentes enzimas con el coágulo para

que ocurra la lisis de la malla de fibrina, este proceso puede verse perturbado (Chapin y Hajjar, 2014).

Esto puede explicar las diferencias registradas en la fibrinólisis de coágulos del paciente y del control (Figura 9), en donde se observó que la velocidad de lisis del paciente fue cinco veces menor a la del control, lo que causa que el Lys50 en el paciente se encuentre prolongado ($2978 \text{ s} \pm 160 \text{ s}$) respecto al control ($1436 \text{ s} \pm 57 \text{ s}$) (Tabla 4).

Mediante la técnica de compactación se puede registrar de forma indirecta la elasticidad de la malla de fibrina. El módulo elástico de la malla de fibrina depende en gran medida de la rigidez de las fibras, ya que es una medida de la resistencia de la red ante el estrés mecánico. Gerth y col. (1974) demostraron que coágulos compuestos por fibras gruesas presentaban una mayor elasticidad en comparación con los coágulos con fibras finas, cuya rigidez se veía incrementada considerablemente. Este hecho fue atribuido a la existencia de una mayor densidad de fibras en este último tipo de coágulo, que además se encontraba más ramificado.

Los coágulos formados a partir de plasma del paciente se compactaron un 13% menos que los coágulos del control (Tabla 3 y Figura 8), lo cual se corresponde a lo esperado de acuerdo a la estructura de la fibrina de este Fg anormal.

Por otra parte, Nair y Shats (1997) encontraron que en redes formadas a partir de plasma, la compactación se correlacionaba con el grado de entrecruzamiento, de forma tal que los coágulos que se encontraban completamente entrecruzados eran más resistentes ante los efectos causados por la fuerza centrípeta durante la centrifugación, mientras que aquellos parcialmente entrecruzados colapsaban fácilmente, debido a que el FXIII cataliza la

formación de enlaces covalentes entre cadenas adyacentes, proceso que ocurre luego de su unión con las regiones C-terminal de las cadenas γ (Voet y Voet, 2004), que permite la formación de enlaces peptídicos entre residuos específicos de glutamina: Gln328 y 336 (Cottrell y col., 1979) y lisina: Lys508, Lys556 y Lys562 (Sobel y Gawinowicz, 1996), ninguno de los cuales se ve afectado por la mutación del paciente estudiado en el presente trabajo. Se necesita realizar estudios sobre el entrecruzamiento de la fibrina del paciente por el FXIII para poder realizar inferencias sobre su efecto del grado de entrecruzamiento en la elasticidad de la malla de fibrina.

El paciente tiene historia familiar de trombosis (aunque no se han reportado complicaciones trombóticas en él hasta el presente, ni en el Caracas II). Desconocemos si esto esté relacionado a la patología del fibrinógeno, ya que haría falta realizar estudios en otros miembros de la familia que presenten la mutación y trombosis.

En resumen, los resultados obtenidos en la presente investigación muestran la importancia de la relación entre la estructura y la función del Fg. Se evidencia la relevancia de los dominios α C del Fg en la formación, degradación y estructura de la malla de fibrina y cómo una mutación que afecte esta región altera las características de la misma. Además se pudo constatar que aunque dos individuos posean la misma mutación en la molécula del Fg, no necesariamente el Fg y los coágulos formados a partir de él presentan las mismas características.

CONCLUSIONES

1. El paciente presenta una mutación (heredada de su padre) en la cadena A α del Fg: A α Ser434→ Asn, que genera una secuencia consenso del tipo Asn-X-Ser, causando una N-glucosilación en Asn 434.
2. El carbohidrato adicional se une en los dominios α C del Fg, región que está implicada en el proceso de asociación lateral de las protofibrillas, lo que posiblemente causa un aumento en las fuerzas de repulsión entre los monómeros de fibrina anormales, disminuyendo la velocidad de formación de la malla de fibrina y la turbidez máxima detectada por el ensayo de polimerización., generando coágulos con una alta densidad de fibras muy finas y una porosidad reducida.
3. El proceso de degradación de la red de fibrina se encuentra alterado debido a su estructura. El reducido tamaño de los poros y la alta densidad de fibras del coágulo enlentecen la disolución del coágulo.
4. La arquitectura de la malla de fibrina tiene efectos sobre sus características biofísicas; la permeabilidad se encuentra reducida y el coágulo tiene una mayor resistencia a la compactación, es menos elástico.
5. Las características biofísicas y estructurales del Fg del paciente en este estudio indican la importancia de los dominios α C del Fg en la agregación de monómeros de fibrina. Defectos en estas regiones llevan a la generación de coágulos poco permeables, de rigidez aumentada, con una alta densidad de fibras y una disminución en el diámetro de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, A. 2004. Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento en Reumatología. Editorial médica Panamericana. Primera Edición. Madrid, España.
- Blombäck, B., Carlsson, K., Hessel, B., Liljeborg, A., Procyk, R., Aslund, N. 1989. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochem. Biophys. Acta.* **27; 997 (1-2):**96-110
- Carr ME. y Hermans, J. 1978. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules.* **11:** 46-50
- Carter A., Cymbalista C., Spector T., Grant P. 2007. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27 (12):** 2783 - 2789.
- Chapin, J., Hajar, K., 2014. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **29:** 17–24
- Chung, D., Harris, J. y Davie, E. 1990. Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation and Fibrinolysis. Edited By C.Y. Liu and S. Chien. Editorial Plenum Press. Primera Edición. New York, Estados Unidos.
- Collet, JP., Moen, J., Veklich, Y., Gorkun, O., Lord, S., Montalescot, G., Weisel, J. The α C domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood.* **106:** 3824 - 3830

- Collet, JP., Woodhead, J., Soria, J., Mirshahi, M., Caen, J. y Weisel, J., 1996. Fibrinogen Dusat: Electron Microscopy of Molecules, Fibers and Clots, and Viscoelastic Properties of Clots. *Biophys. J.* **70**: 500 – 510
- Cottrell, BA., Strong, DD., Watt KW. y Doolittle RF. 1979. Amino acid sequence studies on the alpha chain of human fibrinogen. Exact location of cross-linking acceptor sites. *Biochemistry.* **18 (24)**:5405-10.
- Cunningham, M., Brandt, J., Laposata, M., Olson, J. 2002. Laboratory Diagnosis of Dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med.***126**: 499–505
- Dang, Ch., Shin, Ch. , Bell, W., Nagaswarnill, Ch. y Weisell, J. 1989. Fibrinogen Sialic Acid Residues Are Low Affinity Calcium-binding Sites That Influence Fibrin Assembly. *J. Biol. Chem.* **264 (25)**: 15104-1510
- Doolittle, R. 1973. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. *Adv. Protein Chem.* **27**: 1–109.
- Ebert, R. 1991. *Index of Variant Human Fibrinogens.* CRC Press. 1ra Edición. Florida, Estados Unidos.
- Gelder, JM., Nair, CH. y Dhall, DP. 1995. The permeability of fibrin network developed in human plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **6**: 293-301
- Gómez, R., Guerra, T., Dita, L., Fernández, J., Cabrera, M. 2011. Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *MediSur.* **9 (2)**: 65-74

- González, Q., Murillo, M. 2008. Modelo celular de la coagulación. Hemostasia y Trombosis. Rev Hemo Trombo. **2 (1)**: 59-65
- Handin, R., Lux, S., Stossel, T. 2003. Blood. Principles and practice of Hematology. Lippincott Williams & Wilkins. Segunda edición. Philadelphia, E.U.A.
- Hanss, M., Vergnes, C., Rugeri, L., Ffrench, P. y De Manzancourt, P. A new electrophoretic variant of fibrinogen associated with venous thromboembolism, fibrinogen Bordeaux A α Arg 439→Cys. J Thromb Haemost. **6**: 1422–1424
- Hoffman M. 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Rev. **17 (1)**:S1-S5
- Jakobsen, E., Kierulf, P. 1973, A modified beta-alanine precipitation procedure to prepare fibrinogen free of antithrombin-III and plasminogen. Thromb. Res. **3**: 145-159
- Kolde, H., 2004. Haemostasis. Pentapharm Ltd. Segunda Edición. Muttenz, Suiza.
- Koopman, J. 1992. Structure – Function Analysis Of hereditary variant human fibrinogens. Tesis doctoral, Universidad de Leiden, Leiden, Holanda.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227 (5259)**: 680-685.
- Lauricella, A. 2007. Variabilidad de las redes de fibrina. Acta bioquím. clín. Latinoam. **41**: 7-19

- Longstaff, C., Kolev, K. 2015. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* **13** (1): 98–105.
- Maekawa, H., Maekawa, Yamazumi, K., Muramatsu, S., Kaneko, M., Hiratag, H., Takahashill, de Bosch, N., Carvajal, Z., Ojeda, A., Arocha-Piñango, C., Matsuda, M., 1991. An A α Ser-434 to N-Glycosylated Asn Substitution in a Dysfibrinogen, Fibrinogen Caracas II, Characterized by Impaired Fibrin Gel Formation. *J. Biol. Chem.* **266** (18):11575-11581.
- Marchi, R., Arocha-Piñango, C., Nagy, H., Matsuda, M. y Weisel, J. 1990. The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen on polymerization and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen Lima (A α Arg141→Ser with extra glycosylation). *J. Thromb. Haemost.* **2**: 940–948
- Marchi, R., Arocha-Piñango, Gil, F., 1990. Electron Microscopy studies of 7 patients with dysfibrinogenemia and some of their relatives. *Rev. Iberoamer. Thromb. Hemost.* **3**: 185-90
- Marchi, R. 2012. Fibrinogen and Fibrin: Structure and functional aspects. *Thrombin: function and pathophysiology.* Nova science publishers. New York. EUA.
- Marchi, R. Brennan, S. Meyer, M. y col. 2013. A novel mutation in the FGB: c.1105C>T turns the codon for amino acid B β Q339 into a stop codon causing hypofibrinogenemia. *Blood Cells Mol Dis.* **50**:177–181.

- Marchi, R., Lundberg, U., Grimbergen, J., Koopman, J., Torres, A., de Bosch, NB., Haverkate, F. y Arocha Piñango, CL. Fibrinogen Caracas V, an abnormal fibrinogen with an Aalpha 532 Ser→Cys substitution associated with thrombosis. *Thromb Haemost.* **84 (2)**:263-70.
- Marchi, R., Rojas, H., 2015. Effect of von Willebrand factor on clot structure and lysis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **26 (5)**: 533-536
- Martínez, C., 2006. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev. Med. Inst. MexSeguro Soc.* **44 (2)**: 51-58
- Nair, C., Shats, E., 1997. Compaction as a Method to Charaterise Fibrin Network Structure: Kinetic Studies and Relationship to Crosslinking. *Thromb. Res.* **88**: 381-387
- Rada, A., Taboada, G. 1998. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. *Biofarbo.* **7**: 63 – 67
- Rosser, R., Roberts, W. y Ferry, J. 1977. Rheology of fibrin clots. IV. Darcy constants and fiber thickness. *Biophys. Chem.* **7**: 153 - 157
- Ryan, E., Mockros, L., Weisel, J., Lorand, L., 1999. Structural Origins of Fibrin Clot Rheology. *Biophys. J.* **77**: 2813-2826
- Sobel, J. y Gawinowicz, MA. 1996. Identification of the α Chain Lysine Donor Sites Involved in Factor XIII_a Fibrin Cros-Linking. *J. Biol. Chem.* **271 (32)**: 19228 - 19297

- Sociedad de Cirujanos Generales del Perú. 2006. Ciencias Básicas en Cirugía. Editorial Medical Times, S.A.C. 1ra Edición. Lima, Perú.
- Sugo, T., Nakamikawa, C., Takano, H., Mimuro, J., Yamaguchi, S., Mosesson, MW., Takahashi, N., Takahashi, H., Nagai, K., Matsuda, M., (1999) Fibrinogen Niigata With Impaired Fibrin Assembly: An Inherited Dysfibrinogen With a B β Asn-160 to Ser Substitution Associated With Extra Glycosylation at B β Asn-158. *Blood*: **94 (11)**: 3806-3813.
- Voet, D. y Voet, J., 2004. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana. 3ra Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Weisel, J. 2005. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **70**: 247–299
- Weisel, J., Medved, L. 2001. The Structure and Function of the α C Domains of Fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* **936**: 312-27
- Weisel, J. y Nawasami, C. 1992. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys. J.* **63**: 111-128
- Wolberg, A., y Campbell, R., 2008. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *TransfusApherSci.***38 (1)**: 15–23
- Woodhead, J., Chandrasekaran, N., Matsuda, M., Arocha-Piñango, C., Weisel, J., 1996. The Ultrastructure of Fibrinogen Caracas II Molecules, Fibrin and Clots. *J. Biol. Chem.* **271 (9)**: 496-4953

- Yamazumi, K., Shimura, K., Terukina, S., Takahashi, N., Matsuda, M., 1989. A gamma methionine-310 to threonine substitution and consequent N-glycosylation at gamma asparagine-308 identified in a congenital dysfibrinogenemia associated with posttraumatic bleeding, fibrinogen Asahi. *J. Clin. Invest.* **83 (5)**:1590-1597

Consulta en línea

- Clínica Universidad de Navarra. Coagulación (hemostasia y trombosis) [En línea] 2015. [Citado el 22 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/pruebas-diagnosticas/coagulacion-hemostasia-trombosis>
- Dalmau, A. Fisiología de la hemostasia [En línea] 2015. Societat Catalana d'Anestesiologia. URL disponible en: <http://www.scartd.org/arxius/hemostasia>. [Consulta: 12 de Noviembre de 2015]
- Indiana Hemophilia & Thrombosis Center, inc. Clotting Disorders. Thrombosis. [En línea]. 2012. [Citado el 18 de octubre de 2016]. Disponible en: http://www.ihtc.org/payors/conditions-we-treat/clotting-disorders/thrombosis/#what_is_thrombosis
- Johns Hopkins University. Coagulationcascade [En línea] 2001. [Consulta: 11 de Febrero de 2016]. Disponible en: URL:<http://www.hopkinsmedicine.org/hematology/Coagulation.swf>

- King, M. Coagulación sanguínea [En línea]. The medical biochemistry page. 2015.
URL: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/blood-coagulation-sp.php>.
[Consulta: 20 de Enero de 2016]
- Ruiz, M. 2011. Medicopedia. Diccionario Médico Interactivo.
http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Propositus
- URL: https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm, [Consulta: 12 de Febrero de 2016]
- URL: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/2225/1/Sistema-de-coagulacion.html> [Consulta: 16 de Marzo de 2016]
- URL: <http://saulvelazquez.blogspot.com/2013/02/vias-y-cascada-de-la-coagulacion.html>,
[Consulta: 02 de Octubre de 2016]

ANEXOS

Anexo n°1

Modelo de Consentimiento informado

INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

En el Centro de Medicina Experimental, Laboratorio de Fisiopatología, Sección Biología del Desarrollo de la Hemostasia, del Instituto Venezolano de investigaciones Científicas (IVIC) se va a llevar a cabo el proyecto de investigación titulado estudio de fibrinógenos anormales: relación estructura y función”. Los resultados de la presente investigación pueden ayudar los pacientes con el padecimiento a guiar el tratamiento médico y a establecer medidas profilácticas en caso de sintomatología trombótica.

Su participación en el proyecto consiste en donar, de manera voluntaria, al Grupo de Investigación a cargo de la Dra. Rita Marchi, del IVIC, una muestra de sangre de 20 ml, la cual se le extraerá de la vena de la región anterior del antebrazo, previa desinfección del área de la piel, por una persona capacitada en este procedimiento.

Los estudios a realizar en las muestras de sangre por Ud. donadas no tendrán ningún costo económico y su contribución ayudará al avance de la investigación científica. Su participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno adicional para su Salud. Usted puede retirarse del proyecto en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para usted.

Los resultados de las pruebas realizadas serán entregados oportunamente y serán usados por el grupo de investigación solamente con fines académicos.

El equipo de investigadores le garantiza confidencialidad relacionada tanto con su identidad como la de cualquier información relativa a su persona a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.

Cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, le será respondida oportunamente por parte del clínico a través de los teléfonos 0212-5622325 (Dra. Arlette de Sáez, Banco Municipal de Sangre) y 0212-5041526 (Dra. Rita Marchi, Laboratorio de Fisiopatología del IVIC).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo. _____ C.!.: _____

Nacionalidad _____ Estado Civil _____ Domiciliado en:

_____ teléfono de

contacto _____, siendo mayor de edad en uso pleno de mis facultades mentales,

en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y

riesgos relacionados con el estudio y sin que medie coacción ni violencia alguna, declaro

mediante la presente:

1.- Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte del investigador responsable del proyecto del Laboratorio de Fisiopatología, Sección Biología del Desarrollo de la Hemostasia, Centro Medicina Experimental, IVIC, Dra. Rita Marchi, de

todos los aspectos relacionados al proyecto titulado “Estudio de fibrinógenos anormales: relación estructura y función”.

2.- Tener conocimiento claro de que el objetivo fundamental del trabajo antes señalado es: estudiar la relación de la anormalidad del fibrinógeno y su relación con la clínica del paciente.

3.- Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

4.- Si existiera excedente de plasma en este estudio:

_____Autorizo a que sea guardado y utilizado en futuros estudios, siempre y cuando sus resultados sean utilizados con fines académicos y no comerciales, previa aprobación del Comité de Bioética.

_____No autorizo a guardar el excedente.

5.- Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, le será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores antes mencionado con quienes me puedo comunicar por los teléfonos 0212-5622325 (Dra. Arlette de Sáez., Banco Municipal de Sangre) y 0212-5041526 (Dra. Rita Marchi, Laboratorio de Fisiopatología del IVIC).

6.- Cualquier eventualidad cómo consecuencia de la toma de muestra será debidamente atendida por el personal calificado que labora en las instalaciones donde se realiza la toma de muestra.

DECLARACION VOLUNTARIA:

Declaro haber sido informado sobre el objetivo, sobre los riesgos y beneficios la participación del proyecto y luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a esta planilla de consentimiento, expreso que mi participación en este estudio es totalmente voluntaria, acordando:

- A. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores del Laboratorio de Fisiopatología, Sección Biología del Desarrollo de la Hemostasia, Centro Medicina Experimental, IVIC, a realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.
- B. Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.
- C. Ratificando que no recibiré remuneración alguna por participar.

_____	_____
Firma del Voluntario	Firma del Investigador
Nombre _____	y Nombre _____ y
Apellido: _____	Apellido: _____
C.I.: _____	C.I.: _____
Lugar: _____	Lugar: _____
_____	_____

Fecha:_____

Fecha:_____

Firma del Testigo

Nombre y Apellido:_____

C.I.:_____

Lugar:_____

Fecha:_____

DECLARACION DE LOS INVESTIGADORES PRINCIPALES:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certificamos, mediante la presente, que a nuestro leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio. Además, asegurando que el proyecto no generará beneficios económicos, sólo académico.