

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Mecanismo de acción del sistema plasminógeno-plasmina en
la fibrinólisis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Dolores Solís Sánchez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica

TP
1988
343



* 5 3 0 9 8 7 7 4 6 1 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53-086530 -x

**MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA
PLASMINOGENO-PLASMINA EN LA
FIBRINOLISIS**



M.^a Dolores Solís Sánchez

Madrid, 1988

Colección Tesis Doctorales. N.º 343/1988

• **M.ª Dolores Solís Sánchez**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 - 28015 Madrid
Madrid, 1988
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-22914-1988**

M.ª DOLORES SOLIS SANCHEZ

Mecanismo de acción del
sistema plasminógeno - plasmina
en la fibrinólisis

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR

TERESA DIAZ GARCIA - MAURIÑO

INSTITUTO DE QUIMICA-FISICA «ROCASOLANO»
C. S. I. C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

MADRID 1986

A Michel.
Y a la memoria de Ana Solís,
Mariano Sánchez y
Miguel Angel Pérez.

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Química Física de Macromoléculas Biológicas del Instituto de Química Física "Rocasolano", perteneciente al C.S.I.C., bajo la dirección de la Dra. Teresa Díaz García-Mauriño a quien deseo expresar mi más sincero agradecimiento por su apoyo y dedicación.

También quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Armando Albert por su asesoramiento y valiosa discusión de los resultados, a la Dra. Pilar Usobiaga por su inestimable colaboración en los estudios de ultracentrifugación analítica, a la Dra. Margarita Menéndez por su interés en el trabajo y la ayuda prestada y a todos los compañeros de laboratorio por su aliento y colaboración constantes.

INDICE

	<u>Página</u>
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
I.1. EL MECANISMO DE LA HEMOSTASIA	2
I.2. ESTRUCTURA DEL FIBRINOGENO	4
I.3. DEGRADACION DEL FIBRINOGENO POR PLASMINA	11
I.4. COAGULACION DEL FIBRINOGENO	15
I.4.1. Vía extrínseca	15
I.4.2. Vía intrínseca	19
I.4.3. Vía común clásica	22
I.4.4. Transformación de fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina	23
I.5. DEGRADACION DE LA FIBRINA POR PLASMINA	29
I.6. ESTRUCTURA DEL PLASMINOGENO Y LA PLASMINA	30
I.7. ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO	37
I.7.1. Activación intrínseca	37
I.7.2. Activación extrínseca	38
I.7.2.1. Uroquinasa y prouroquinasa	38
I.7.2.2. Activador tisular	40
I.7.3. Activación exógena	42
I.7.3.1. Estreptoquinasa	42
I.8. INHIBIDORES DE PLASMINA	44
I.8.1. α_2 -antiplasmina	44
I.9. MECANISMO DE LA FIBRINOLISIS	45
I.10. LECTINAS: PROPIEDADES Y APLICACIONES	47
I.10.1. Concanavalina A	48
I.10.2. Lectina de Lens culinaris	51
I.11. OBJETIVOS	52

II.	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	54
II.1.	PREPARACION DE PLASMA	55
II.2.	PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FIBRINOGENO	55
II.2.1.	Purificación de fibrinógeno	55
II.2.2.	Determinación de la concentración de fibrinógeno	56
II.2.3.	Determinación del porcentaje de proteína coagulable	56
II.2.4.	Determinación de la velocidad de coagulación	57
II.3.	PREPARACION Y CARACTERIZACION DE PLASMINOGENO	57
II.3.1.	Determinación de la concentración de plasminógeno	57
II.3.2.	Determinación de la actividad del complejo plasminógeno-estreptoquinasa	58
II.3.3.	Obtención de Lys-plasminógeno a partir de Glu-plasminógeno	58
II.3.4.	Caracterización del plasminógeno por análisis del grupo aminoterminal con cloruro de dansilo	59
II.4.	ESTUDIOS DE FIBRINOLISIS EN PLASMA Y SISTEMA PURIFICADO	60
II.4.1.	Preparación de coágulos de plasma	60
II.4.2.	Preparación de coágulos de fibrina (sistema purificado)	60
II.4.3.	Fibrinólisis exógena	61
II.4.4.	Fibrinólisis endógena	61
II.5.	OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS FRAGMENTOS D Y E DE DIGESTION DEL FIBRINOGENO POR PLASMINA	62
II.5.1.	Digestión del fibrinógeno por plasmina	62

II.5.2. Fraccionamiento del digerido por cromatografía de intercambio iónico en Sepharosa-lisina	62
II.5.3. Determinación de la concentración de los fragmentos D y E	63
II.6. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LECTINAS	64
II.6.1. Concanavalina A y acetil-concanavalina A	64
II.6.1.1. Preparación de acetil-concanavalina A	64
II.6.1.2. Determinación de la concentración	64
II.6.2. Lectina de Lens culinaris	65
II.6.2.1. Purificación de la lectina de Lens culinaris	65
II.6.2.2. Determinación de la concentración	65
II.6.2.3. Determinación de la actividad hemaglutinante	66
II.6.3. Marcaje de lectinas con ¹²⁵ I	66
II.7. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS LECTINA-FIBRINOGENO/MONOMERO DE FIBRINA/FRAGMENTOS D Y E	67
II.7.1. Preparación de complejos lectina-fibrinógeno/fragmentos D y E	67
II.7.2. Preparación de complejos lectina-monómero de fibrina	67
II.7.2.1. Obtención de monómeros de fibrina	67
II.7.2.2. Formación de los complejos	68
II.7.3. Unión de ¹²⁵ I-acetil-concanavalina A al fibrinógeno	68

II.7.4. Unión de ¹²⁵ I-lectinas a Sepharosa-fibrinógeno	69
II.7.5. Unión covalente de ¹²⁵ I-concanavalina A y ¹²⁵ I-lectina de Lens culinaris al fibrinógeno y sus fragmentos mediante el empleo de un reactivo bifuncional	70
II.7.6. Cromatografía de afinidad en Sepharosa-lectina	71
II.7.7. Determinación de coeficientes de sedimentación	71
II.8. ESTUDIOS DE LISIS POR PLASMINA DE FIBRINOGENO MONOMEROS DE FIBRINA Y SUS COMPLEJOS CON LECTINAS	72
II.9. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE COMPLEJOS LECTINA-FIBRINA	72
II.9.1. Obtención de complejos lectina-fibrina	73
II.9.2. Determinación de la velocidad de coagulación de los complejos lectina-fibrinógeno	73
II.9.3. Determinación del porcentaje de proteína coagulable	73
II.9.4. Determinación del grado de entrecruzamiento de la fibrina en los complejos lectina-fibrina	74
II.9.5. Elución de lectinas de los complejos lectina-fibrina	74
II.10. ESTUDIOS DE FIBRINOLISIS DE COMPLEJOS LECTINA-FIBRINA	75
II.10.1. Fibrinolisis exógena	75
II.10.2. Fibrinolisis endógena	75
II.11. DETERMINACION DE PLASMINOGENO UNIDO A FIBRINA	75
II.11.1. Marcaje de plasminógeno con ¹²⁵ I	76

II.11.2. Unión de ¹²⁵ I-plasminógeno a fibrina y a los complejos lectina-fibrina	77
II.11.3. Elución de plasminógeno unido a la fibrina	78
II.12. DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE LAS LECTINAS EN LA FORMACION Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO PLASMINOGENO-ESTREPTOQUINASA	78
II.13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS	79
II.14. ACTIVACION DE SEPHAROSA E INMOVILIZACION DE LIGANDOS	81
II.14.1. Activación de Sepharosa con CNBr	
II.14.2. Unión de lisina a la Sepharosa activada	82
II.14.3. Unión del inhibidor de tripsina a la Sepharosa activada	82
II.14.4. Unión de lectinas a la Sepharosa activada	83
II.14.5. Unión de fibrinógeno a la Sepharosa activada	83
III. <u>RESULTADOS</u>	85
III.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION Y LOCALIZACION DEL ACTIVADOR EN LA FIBRINOLISIS	86
III.1.1. Influencia de la concentración de activador en la fibrinólisis exógena	86
III.1.1.1. Coágulos retraídos	86
III.1.1.2. Coágulos intactos	91
III.1.2. Influencia de la concentración de activador en la fibrinólisis endógena	91
III.2. CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS LECTINA-FIBRINOGENO / FRAGMENTOS D Y E	95

-VIII-

III.2.1. Unión de 125 I-Ac-Con A al fibrinógeno	95
III.2.2. Unión de 125 I-lectinas a Sepharosa-fibrinógeno	95
III.2.3. Estudios de ultracentrifugación analítica de los complejos lectina-fibrinógeno/fragmentos D y E	98
III.2.3.1. Complejos LcH-fibrinógeno	98
III.2.3.2. Complejos Ac-Con A-fibrinógeno	101
III.2.3.3. Complejos Con A-fragmentos D y E	101
III.2.3.4. Complejos Ac-Con A-fragmentos D y E	102
III.2.3.5. Complejos LcH-fragmentos D y E	102
III.2.4. Unión covalente de 125 I-Con A y 125 I-LcH al fibrinógeno	103
III.2.5. Cromatografía de afinidad del fibrinógeno y sus fragmentos D y E en Sepharosa-lectina	109
III.3. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FIBRINOGENOLISIS Y EN LA DIGESTION DE MONOMEROS DE FIBRINA EN SOLUCION	109
III.4. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA COAGULACION	111
III.4.1. Efecto de la Ac-Con A en la velocidad de coagulación del fibrinógeno	111
III.4.2. Influencia de las lectinas en el porcentaje de proteína coagulable	111
III.4.3. Influencia de las lectinas en el tramado de la fibrina	114
III.5. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FIBRINOLISIS	114

III.5.1. Fibrinólisis exógena	114
III.5.1.1. Coágulos retraídos	114
III.5.1.2. Coágulos intactos	120
III.5.2. Fibrinólisis endógena	120
III.6. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA UNIÓN DE PLASMINÓGENO A FIBRINA	124
III.6.1. Unión de ¹²⁵ I-plasminógeno a fibrina	124
III.6.2. Elución de plasminógeno unido a la fibrina	124
III.7. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FORMACION Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO PLASMINÓGENO- ESTREPTOQUINASA	127
IV. <u>DISCUSION</u>	128
IV.1. IMPORTANCIA DE LA CONCENTRACION Y LOCALIZACION DEL ACTIVADOR EN LA FIBRINOLISIS	129
IV.2. ESTUDIO DE LA INTERACCION PLASMINÓGENO-FIBRINA. IDENTIFICACION DE LOS DOMINIOS DEL FIBRINOGENO /FIBRINA IMPLICADOS	135
IV.2.1. Bloqueo selectivo de los dominios D y E del fibrinógeno mediante el empleo de lectinas	135
IV.2.2. Influencia de las lectinas en la interacción plasminógeno-fibrina: unión de plasminógeno y fibrinólisis	143
IV.3. MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA PLASMINÓGENO- PLASMINA EN LA FIBRINOLISIS	151
V. <u>CONCLUSIONES</u>	153
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	157

ABREVIATURAS

Neu	Acido N-acetil-neuramínico
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
Man	Manosa
α -MDGP	α -metil-D-glucopiranosido
Con A	Concanavalina A
Con A T	Concanavalina A tetramero
Con A D	Concanavalina A dímero
Con A M	Concanavalina A monómero
Ac-Con A	Acetil-concanavalina A
LcH	Lectina de Lens culinaris
Fg	Fibrinógeno
Fn	Fibrina
Pg	Plasminógeno
Pm	Plasmina
SK	Estreptoquinasa
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
AntiPm	α_2 -antiplasmina
STI	Inhibidor de tripsina procedente de soja
ϵ -ACA	Acido ϵ -aminocaproico
DTBP	Dimetil 3,3'-ditiobis-propionimidato
DMS	Dimetil-suberimidato
CNBr	Bromuro de cianógeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletildiamina
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
pNA	p-nitroanilida
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

-XI-

UC Unidad caseinolítica
NIH Unidad estandar de trombina del National Institute
 of Health (USA)

-1-

I. INTRODUCCION

I.1. EL MECANISMO DE LA HEMOSTASIA

El término hemostasia incluye una serie de mecanismos relacionados entre sí, encaminados al mantenimiento de la fluidez del sistema cardiovascular y a la prevención de hemorragias provocadas por la lesión o ruptura de vasos sanguíneos.

En el estado normal, las plaquetas, de forma discoidal, fluyen libremente a través de los vasos sanguíneos intactos. Cuando el vaso sufre una lesión, se expone una línea subendotelial a la que se adhieren las plaquetas en segundos, cambiando su forma con objeto de obtener la mayor área en común con la zona dañada. Como consecuencia de esta adhesión, las plaquetas comienzan a liberar una serie de sustancias, varias de ellas de gran importancia en la hemostasia, entre las que se encuentran fibrinógeno, ADP, 5-hidroxitriptamina y el factor 3 plaquetario. La agregación de las plaquetas viene mediada por el fibrinógeno cuya estructura bivalente y simétrica permite formar puentes interplaquetarios uniendo los receptores de fibrinógeno de plaquetas adyacentes inducidos en la membrana tras la perturbación. El ADP liberado estimula aún más la agregación plaquetar, mientras que la 5-hidroxitriptamina actúa como vasoconstrictor y el factor 3 plaquetario desempeña una función primordial en el mecanismo de coagulación.

Se desarrolla así un tapón plaquetario que junto con la vasoconstricción reduce la pérdida de sangre y rellena la lesión. Este tapón es, sin embargo, todavía permeable y el plasma continúa perdiéndose a través de él por lo que ha de ser reforzado, mediante la participación del mecanismo de coagulación, con la formación de fibrina a partir del fibrinógeno soluble en plasma, constituyéndose así un tapón hemostático estable.

La coagulación debe producirse rápidamente, en cuestión

de minutos o incluso segundos, y permanecer confinada en el área dañada. Por otra parte, la persistencia de la fibrina debe estar limitada por las necesidades hemostáticas del organismo, de forma que cuando el tejido haya sido reparado el coágulo desaparezca. Si la fibrina se forma en el torrente sanguíneo, sin estar unida a un tapón plaquetario o a la pared vascular, debe ser eliminada tan rápidamente como sea posible. El sistema fibrinolítico es el encargado de la disolución de la fibrina sin provocar la ruptura prematura del tapón hemostático o la destrucción de proteínas esenciales del plasma. Una actividad fibrinolítica excesivamente alta puede dar lugar a cuadros hemorrágicos, mientras que una disminución de dicha actividad puede iniciar un estado de hipercoagulabilidad, como ocurre en la aterosclerosis avanzada o en el caso de tumores malignos. Por otro lado, un aumento repentino de sustancias procoagulantes en el torrente sanguíneo puede producir coagulación intravascular, bien localizada (trombosis) o bien de un modo diseminado (coagulación intravascular diseminada). En general, el organismo en estos casos acelera la actividad fibrinolítica con el fin de eliminar los depósitos de fibrina ya formados o incipientes.

Existe pues una finísima línea divisoria entre la hemorragia y la trombosis; un delicado equilibrio entre la formación de un coágulo y su disolución.

I.2. ESTRUCTURA DEL FIBRINOGENO

El fibrinógeno es una glicoproteína compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes, denominadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ , de 610, 461 y 411 aminoácidos, respectivamente. Las seis cadenas se encuentran unidas entre sí por 29 puentes disulfuro (1), constituyendo dos mitades idénticas de forma que la estructura global, con un peso molecular de 340 000, puede describirse como $(A\alpha, B\beta, \gamma)_2$. La estructura primaria completa del fibrinógeno está perfectamente determinada (2-5). Las secuencias de las tres cadenas se muestran en la Fig. 1 y sus composiciones y pesos moleculares en la Tabla 1. La molécula no contiene grupos sulfhidrilo libres.

La comparación de las secuencias de las tres cadenas del fibrinógeno hace pensar en la existencia de un antecesor común, especialmente si se comparan las posiciones de los restos cisteína, las conexiones formadas por los puentes disulfuro y la secuencia alrededor de los mismos. Mientras las cadenas $B\beta$ y γ presentan un 33% de homología en la secuencia completa, la cadena $A\alpha$ sólo presenta un 12% de similitud tanto con la cadena $B\beta$ como con la cadena γ . Por ello se ha sugerido que la molécula de fibrinógeno original estaría formada por 6 cadenas ancestrales idénticas, de las que derivarían primero las cadenas $A\alpha$ y un antecesor común $B\beta-\gamma$, que a su vez sería sustituido por las cadenas $B\beta$ y γ , respectivamente (6).

Las cadenas $B\beta$ y γ contienen cadenas laterales de carbohidrato (7) unidas N-glicosídicamente a las asparaginas 364 y 52, respectivamente. Estas asparaginas se encuentran en la secuencia típica asparagina-X-treonina (o -serina) siendo este el único caso en el que se da esta secuencia tanto en la cadena $B\beta$ como en la γ . La cadena $A\alpha$, a pesar de contener esta se-

1 ADSGEGDFLAEGGGV⁶PRVVERHDSACADSDMPFCSDED
41 WNYKCPGCGCRKGLIDEVHQDFTNRINKLKNLFEYQKNN
81 EDNSLTTNINCILRGDFSSARRHNDTYHRYSEDLRERIC
121 VLKREYIEKVMH10LLQKRVRAOLVCP⁴LLVVDI³IKIRS
161 CRGSSCRALAREVDLEKDYEDQKOLEGVIARDLLPRSDHQ
201 HLP¹L¹IKKPPV¹DLV¹PE¹FK¹SL¹Q¹K¹V¹PE¹AK¹L¹T¹MP¹GR¹RA
241 ELERP⁶GE¹ITR⁶GG⁵TS¹Y¹G¹T¹SE¹SP¹RR¹PS¹AG¹SM¹NS⁶(6)
281 SGP⁶G(6)T⁶GR¹NP¹GS¹ST¹GG¹AT¹MP¹GS¹GP¹ST¹GS¹W¹NS¹GS¹
321 G¹T¹G¹ST¹GH¹NP¹SP¹RP¹GS¹T¹GR¹NP¹GS¹SR¹AG¹MT¹SE¹SV
361 S¹ST¹GH¹NP¹SP¹RP¹GS¹T¹GR¹NP¹GS¹SR¹AG¹MT¹SE¹SV
401 V¹SP¹TR¹RE¹Y¹TE¹KL¹VT¹SE¹GR¹EL¹RT¹GE¹K¹VT¹SG¹ST¹TT¹OR
441 SC¹SK¹TY¹KT¹Y¹IG¹PD¹GH¹EV¹TE¹EV¹TE¹ED¹GS¹DC¹PE¹AMD¹LET
481 L¹SG¹IG¹LD¹GF¹RR¹HP¹DE¹A¹AF¹DT¹AS¹T¹CK¹TF¹PF¹SP¹HL¹EE
521 F¹Y¹SE¹TE¹SR¹GS¹GI¹FT¹N¹TE¹SS¹HN¹PG¹IA¹EP¹SR¹CK¹SS¹Y
561 SK¹Q¹FT¹SS¹TY¹NR¹GD¹ST¹FE¹KS¹Y¹K¹HA¹DE¹AS¹SE¹AD¹HE¹GT¹HS¹
601 ER¹GH¹AK¹SR¹Y

1 2GVHDNEEGFFSA⁶GRPLDKKREEAPSLRPAPP¹ISGGG
41 YRARPARAAAAATKKEVERKAPDAAGGCLHADPPDLGLVLCPTGC
81 DLQEA¹LLQ¹GER¹PI¹RNS¹Y¹DEL¹NR¹HY¹E¹AV¹(s.7)SSSS¹OF¹MY¹L
121 LKDLW¹K¹K¹Q¹K¹Q¹V¹AD¹NE¹V¹Y¹RE¹YS¹SE¹LE¹R¹H¹OL¹Y¹DE¹TV¹NS¹H
161 I¹PT¹LR¹VL¹RS¹I¹EN¹LR¹SA¹IK¹LES¹D¹VS¹AD¹ME¹Y¹CR¹T¹CT¹VS
201 CH¹IP¹Y¹VS¹GE¹CE¹E¹I¹R¹KE¹GE¹T¹SE¹MY¹L¹IP¹DS¹SV¹PE¹RY¹YC
241 D¹NR¹T¹EN¹GG¹TY¹I¹QR¹OD¹GS¹VD¹F¹GR¹K¹ND¹PY¹K¹GF¹EN¹VAT¹T
281 D¹GE¹NY¹CG¹LP¹GE¹Y¹LG¹ND¹K¹J¹SL¹TR¹NS¹P¹TE¹LL¹IE¹ND¹MS¹D
321 KY¹EA¹NY¹GG¹FT¹Y¹OR¹EA¹RY¹O¹SY¹N¹K¹Y¹RT¹ASH¹AL¹ND¹GS¹OL
361 R¹GE¹R¹T¹MT¹I¹NG¹HF¹FT¹Y¹DR¹DD¹CV¹LT¹SD¹PR¹GC¹SK¹ED¹GS
401 G¹W¹Y¹R¹CH¹AAN¹PH¹GR¹Y¹VG¹GO¹Y¹TH¹RA¹AK¹MT¹DD¹GV¹Y¹HR¹H
441 K¹GS¹Y¹SR¹RS¹AK¹IR¹PF¹FP¹GG

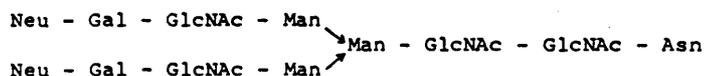
1 YVATRDNCCILDERFSSYCPTTCGIADFLSTYRTKYDEDL
41 Q¹SL¹ED¹IL¹H¹Q¹VE¹KT¹SE¹V¹QL¹IK¹IG¹LT¹Y¹NP¹DES¹SE¹PH¹ID
81 AAT¹L¹K¹SR¹K¹HL¹EE¹IK¹YE¹AS¹IL¹TH¹DS¹IR¹YL¹OE¹I¹Y¹NS¹R¹NO¹K
121 I¹V¹N¹L¹K¹ER¹V¹AD¹EA¹QC¹Q¹EP¹CK¹DT¹Y¹Q¹IND¹IT¹GD¹CD¹DI¹ANK¹G
161 AK¹Q¹SG¹LY¹IK¹PL¹KA¹HO¹FL¹V¹Y¹CE¹ID¹GE¹GN¹HT¹V¹FK¹RL¹DC
201 S¹VD¹FK¹KN¹I¹O¹Y¹KE¹GF¹CL¹S¹PT¹GT¹TF¹HL¹GR¹IK¹HL¹IST¹GS
241 A¹IP¹Y¹AL¹RV¹E¹LED¹NG¹RT¹ST¹AD¹Y¹AF¹K¹Y¹GP¹E¹AD¹K¹Y¹RL¹TY¹AY
281 FAG¹GD¹AG¹D¹AF¹DF¹DF¹ED¹DP¹SK¹FF¹TS¹HN¹GM¹HF¹ST¹MD¹ND¹D
321 KF¹EG¹NC¹AE¹OD¹G(s)G¹W(m)N¹HC¹AG¹HL¹NG¹V¹Y¹GG¹CT¹YS¹KA¹ST¹P
361 HG¹Y¹DN¹GI¹(w)A¹T(w)K¹TR¹W¹YS¹R¹K¹KT¹TK¹I¹PF¹N¹LT¹IG¹EG¹GB¹N
401 H¹L¹G¹GA¹AG¹GD¹Y

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de las cadenas A α , B β y Y del fibrinógeno humano. Las flechas indican los sitios de ataque de la trombina y las cruces la posición de las cadenas laterales de carbohidrato.

Tabla 1. Composición de aminoácidos y carbohidratos del fibrinógeno humano y sus cadenas polipeptídicas.

Aminoácidos		Fibrinógeno	A α	B β	Y.
Alanina	A	152	22	23	26
Arginina	R	154	40	27	10
Asparagina	N	170	30	32	23
Acido aspártico	D	188	34	28	32
Cisteína	C	58	8	11	10
Glutamina	Q	134	18	25	24
Acido glutámico	E	192	44	30	22
Glicocola	G	296	71	42	35
Histidina	H	64	15	7	10
Isoleucina	I	114	16	16	25
Leucina	L	166	29	28	26
Lisina	K	208	39	31	34
Metionina	M	66	10	15	8
Fenilalanina	F	94	19	10	18
Prolina	P	138	35	23	11
Acido piroglutámico	Z	2	-	1	-
Serina	S	280	84	31	25
Treonina	T	196	48	22	28
Triptófano	W	66	10	13	10
Tirosina	Y	100	9	21	20
Valina	V	134	28	25	14
Suma		2964	610	461	411
Carbohidratos					
N-acetilglucosamina	GlcNAc	16	-	4	4
Galactosa	Gal	8	-	2	2
Manosa	Man	12	-	3	3
Acido siálico	Neu	4-8	-	1-2	1-2
Peso molecular calculado					
		337 897	66 062	54 358	48 529

cuencia dos veces, en las asparaginas 269 y 400 (4), no está glicosilada, posiblemente debido a la proximidad de restos prolinea. No existe carbohidrato unido O-glicosídicamente en el fibrinógeno humano. Las 4 cadenas de carbohidrato, idénticas, son de tipo biantenarico y están constituidas por ácido siálico, galactosa, N-acetilglucosamina y manosa (8), según la estructura:



Por tratamiento del fibrinógeno con bromuro de cianógeno no se obtienen los llamados nudos disulfuro que contienen todos los puentes disulfuro de la molécula, denominados FCB 1-5. El nudo disulfuro mayor, FCB 1, también llamado N-DSK (nudo disulfuro N-terminal), contiene junto con los extremos amino terminales de las 6 cadenas, 11 de los 29 puentes disulfuro presentes en la molécula de fibrinógeno (9). De estos 11 puentes, 8 están implicados en asociaciones covalentes intercatenarias dentro de cada hemimolécula. Los restantes 3 puentes disulfuro unen las dos mitades para formar la proteína dimérica, uno de ellos entre las cisteínas 28 de ambas cadenas A α y los otros dos enlaces entre las cisteínas 8 y 9 de una cadena γ con sus correspondientes en la otra cadena γ , formando una conexión cistina doble (10). Recientemente se ha comprobado que estos dos enlaces unen las dos cadenas γ y, por lo tanto, las dos mitades de la molécula de fibrinógeno, en orientación antiparalela, es decir, con la dirección amino-carboxilo terminal opuesta (11).

El segundo nudo disulfuro en tamaño, el FCB 2, contiene partes intermedias de las tres cadenas (12,13), mientras que los otros tres fragmentos menores, FCB 3-5, se corresponden con

los lazos C-terminales de las 3 cadenas (12,14).

En cuatro regiones de la molécula de fibrinógeno (los agrupamientos de la zona N-terminal y los de las zonas intermedias) las tres cadenas se encuentran unidas entre sí por una conexión triple característica formando un anillo disulfuro (13).

La naturaleza de la secuencia de las tres cadenas comprendidas entre los dos anillos disulfuro en cada hemimolécula (aminoácidos 50-160 de la cadena A α , 81-192 de la cadena B β y 24-134 de la cadena γ) hace predecible una conformación en α -hélice, de forma que las tres cadenas se entrelacen en una superhélice de tres hebras (15). Por su parte, las regiones carboxiterminales de las cadenas B β y γ , que presentan una gran homología se plegarían independientemente constituyendo regiones globulares similares, mientras que los dos tercios carboxiterminales de las cadenas A α , de naturaleza predominantemente polar, se encontrarían desplegados, constituyendo un apéndice flotante de la molécula (16).

La estructura postulada a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos confirma el modelo trinodular propuesto por Hall y Slayter en 1959 (17) basado en estudios de microscopía electrónica realizados con la técnica del sombreado. Según este modelo, la molécula de fibrinógeno, con una longitud total de 475 ± 25 Å, estaría formada por dos grandes nódulos periféricos, de 65 Å de diámetro, denominados dominios D, conectados a un nódulo central más pequeño (50 Å de diámetro) denominado E, a través de dos delgadas hebras de 8 a 15 Å de diámetro. Este modelo, mayoritariamente aceptado en la actualidad, proporciona una descripción simplificada válida de la molécula de fibrinógeno y explica numerosas observaciones biofísicas y bioquímicas y, en particular, la polimerización de la fibrina.

Una información más detallada sobre la morfología y dimensiones del fibrinógeno se obtiene a partir del análisis de ordenamientos cristalinos. El fibrinógeno nativo no cristaliza pero se pueden producir cristales después de una ruptura limitada de la molécula con una proteasa bacteriana (18,19), sin que se pierda más del 5-10% de la masa total de la molécula ni se modifique sustancialmente la ordenación de los monómeros de fibrina (20). Se comprueba así que la molécula de fibrina, de 450 Å de longitud total, está formada por 7 dominios globulares conectados por segmentos en forma de varilla (21). Los dominios D periféricos del modelo trinodular, incompletamente resueltos mediante la técnica de sombreado utilizada por Hall y Slayter, están formados por dos subdominios de aproximadamente el mismo tamaño, proximal y distal, constituidos por las regiones carboxiterminales de las cadenas B β y γ , respectivamente, y que se encuentran desplazados lateralmente con respecto al eje de la molécula y a distinta distancia del dominio central. Por otra parte, las estrechas conexiones existentes entre el dominio central y los dominios periféricos, cuya estructura es la de una superhélice de tres cadenas, se encuentran interrumpidas por una pequeña región globular desplazada hacia los dominios exteriores con respecto al centro de cada hemimolécula (21,22).

Uno de los hallazgos más recientes y sorprendentes sobre la estructura del fibrinógeno, realizado por microscopía electrónica, es el de un nódulo extra central, algo menor que el dominio E y situado encima de éste, perpendicular al eje de la molécula y generalmente equidistante de los dominios periféricos (22,23). Este octavo dominio, o dominio α , está formado por los extremos carboxiterminales de ambas cadenas A α plegadas desde los extremos de las varillas conectoras hacia el

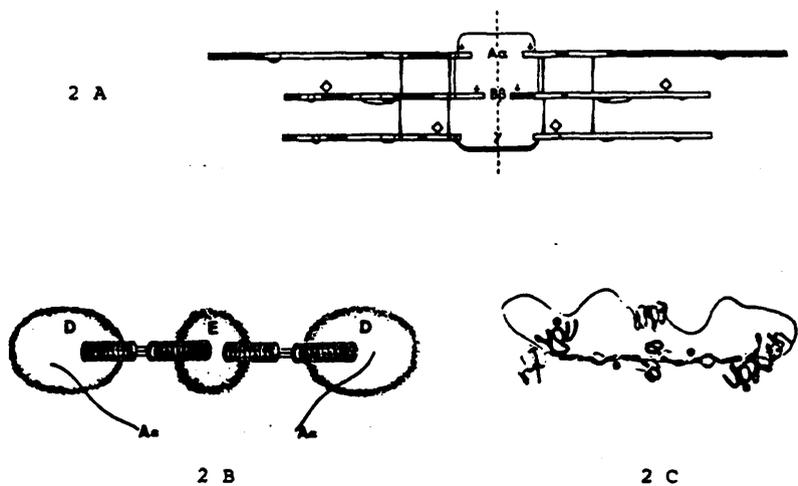


Figura 2. Modelos estructurales del fibrinógeno. 2 A - Modelo de la estructura primaria. Las cadenas se muestran alineadas según su homología y conectadas por los anillos disulfuro. Las flechas indican los puntos de ataque de la trombina y los rombos las cadenas laterales de carbohidrato. En la parte izquierda se encuentran representados en blanco los nudos disulfuro que se obtienen por tratamiento del fibrinógeno con bromuro de cianógeno y en la parte derecha del modelo se representan en blanco los fragmentos de degradación D y E. 2 B - Representación esquemática del modelo trinodular del fibrinógeno propuesto por Hall y Slayter. 2 C - Representación del modelo heptanodular del fibrinógeno. Las cadenas A_α se muestran plegadas hacia el centro formando un octavo dominio α central. Las cadenas de carbohidrato se encuentran representadas por hexágonos negros. El eje binario de la molécula es perpendicular a la página aunque el dominio α se represente desplazado del eje.

centro de la molécula donde se unen formando una pequeña región globular (23). El hecho de que este dominio sea visible en sólo algunas moléculas de fibrinógeno puede ser debido a una superposición con el dominio central E o a un desplegamiento de la estructura en las preparaciones para microscopía o bien a la susceptibilidad de las cadenas $A\alpha$ a la proteólisis. El tratamiento del fibrinógeno con proteasas bacterianas, hasta el momento paso necesario en la cristalización del fibrinógeno, provoca la pérdida de los extremos carboxiterminales de las cadenas $A\alpha$ y, por lo tanto, del dominio α , de ahí que no sea visible en los análisis cristalográficos (22).

I.3. DEGRADACION DEL FIBRINOGENO POR PLASMINA

La caracterización de los productos generados en la digestión del fibrinógeno por plasmina no sólo proporciona información acerca del proceso de degradación, sino también acerca de la estructura del fibrinógeno.

Según el modelo asimétrico, propuesto por Marder et al. (24) en base a estudios inmunológicos y de ultracentrifugación analítica, el fibrinógeno es degradado progresivamente primero a fragmento X (simétrico), el cual es escindido en un fragmento D más un fragmento Y (asimétrico) y finalmente éste último es escindido en un fragmento E y otro fragmento D. Correlacionando el orden de aparición de estos fragmentos con sus estructuras ha sido posible desarrollar un modelo para la digestión del fibrinógeno (Figura 3) (25,26).

El producto inicial de la digestión, denominado fragmento X, es estructuralmente heterogéneo, ya que presenta formas en las que varía el alcance de la degradación de sus cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ (27). Las cadenas $A\alpha$ son las primeras en ser degra-

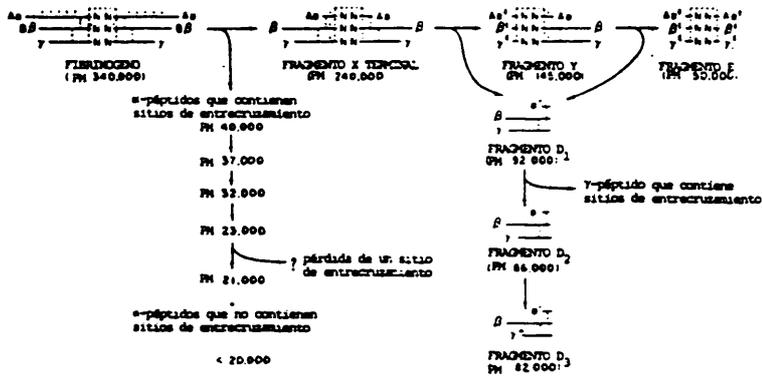


Figura 3. Representación esquemática de la digestión de fi brinógeno por plasmina. Los puntos de ataque de la plasmina están señalizados. Las líneas discontinuas indican el número mínimo de puentes disulfuro presentes en cada fragmento.

dadas por la plasmina, liberándose un gran péptido de 40 000 Da de peso molecular que es casi simultáneamente degradado a formas de 37 000, 32 000, 23 000 y 21 000 Da. Los α -péptidos de pesos moleculares 23 000 a 40 000 contienen los dos sitios aceptores de entrecruzamiento de la cadena $A\alpha$, mientras que el péptido de 21 000 Da sólo contiene uno de estos sitios. El fragmento X, por lo tanto, no contiene sitios de entrecruzamiento α (26). Las cadenas $B\beta$ son degradadas a continuación por su extremo amino terminal, eliminándose el péptido $B\beta_{1-42}$ (27,28), de aproximadamente 5 000 Da; se pierde, por lo tanto, el fibrinopéptido B. La forma más degradada del fragmento X, de 240 000 Da de peso molecular, está por lo tanto constituida por derivados de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$, denominados $A\alpha'$ (25 000 Da) y β' (49 000 Da), respectivamente y por cadenas γ intactas.

El ataque de la plasmina al fragmento X terminal tiene como resultado la aparición de un fragmento D, de 92 000 Da, y un fragmento Y (145 000 Da) asimétrico. El fragmento Y es está constituido por dos clases de cadenas polipeptídicas: las de mayor tamaño son prácticamente idénticas que las presentes en la forma terminal del fragmento X ($A\alpha'$, β' , γ), mientras que las de menor tamaño son similares a las cadenas que constituyen el fragmento E ($A\alpha^E$, β^E , γ^E). Por la acción continuada de la plasmina sobre el fragmento Y se obtiene otro fragmento D más un fragmento E de 50 000 Da de peso molecular, derivado de la región aminoterminal de la molécula de fibrinógeno.

La estructura del fragmento E es muy similar a la del nudo disulfuro aminoterminal que se obtiene por tratamiento del fibrinógeno con bromuro de cianógeno (29). La primera de las formas del fragmento E generadas con el tiempo por la plasmina carece del fibrinopéptido B pero no del fibrinopéptido A (27), mientras que la forma terminal carece de ambos fibrinopép

tidos A y B (30, 31). Las cadenas constituyentes de este fragmento tienen pesos moleculares que varían desde 7 500 para la cadena β^E , hasta 11 500 para la cadena α^E . La cadena γ^E , con un peso molecular de 8 500 Da conserva la porción de carbohidrato unida en la Asp-52 N-glicosídicamente (31).

Existen al menos tres formas mayoritarias del fragmento D, D_1 , D_2 y D_3 , de pesos moleculares 92 000, 86 000 y 82 000 Da, respectivamente, las cuales difieren en el grado de degradación de la cadena γ por su extremo carboxiterminal: γ' (38 000), γ'' (32 000) o γ''' (28 000), respectivamente. Todas contienen los mismos derivados de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$, de 12 000 Da (α'') y 42 000 Da (β''), respectivamente (26). La cadena β'' conserva también unida la porción de carbohidrato. La especie de mayor tamaño, el fragmento D_1 , posee los sitios de entrecruzamiento de la cadena γ (26), capacidad para inhibir la polimerización de fibrina (31), un sitio de unión para el calcio (32) y un sitio de unión para el receptor plaquetario del fibrinógeno (33), mientras que los fragmentos D_2 y D_3 carecen de todas estas propiedades. La presencia de iones calcio en concentraciones comparables a las existentes en el plasma protege al fragmento D_1 de un ulterior ataque de la plasmina evitando la degradación de la cadena γ' (34).

Los productos terminales de la digestión del fibrinógeno por plasmina son, por lo tanto, dos fragmentos D y un fragmento E. Estos fragmentos parecen conservar esencialmente las dimensiones de los dominios D y E del modelo trinodular (35), lo que sugiere que la proteólisis está asociada solamente con una limitada perturbación de la organización del dominio. Sin embargo, la pérdida de expresión en los fragmentos de determinados antígenos característicos del fibrinógeno, así como la aparición de neoantígenos en cada fragmento, D_{neo} y E_{neo} , indi-

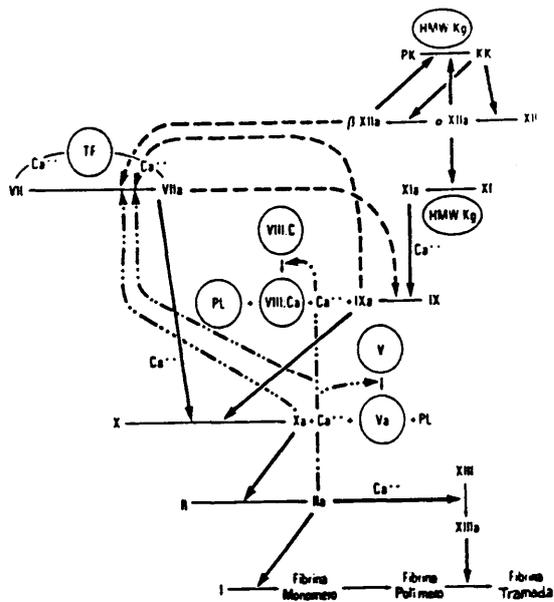
ca que la proteólisis también altera la conformación de los dominios lo suficiente como para engendrar nuevos determinantes antigénicos (36,37).

I.4. COAGULACION DEL FIBRINOGENO

La coagulación supone la interrelación de dos vías enzimáticas distintas, la vía extrínseca y la vía intrínseca, que convergen en una vía común cuyo paso último es la transformación del fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina. Hasta el momento han sido reconocidas 12 proteínas plasmáticas como factores de la coagulación (Tabla 2). Además de estos, el calcio y el factor tisular son a veces designados como factor IV y factor III, respectivamente.

I.4.1. Vía extrínseca

La vía extrínseca clásica, establecida por deficiencias del factor X, implica la activación del factor X por el complejo factor tisular-factor VIIa (38). El factor VII es único entre los zimógenos de la coagulación ya que presenta cierta actividad intrínseca en su forma nativa; sin embargo, es inactivo sobre sus sustratos fisiológicos en ausencia del factor tisular. Este factor, también denominado factor III o tromboplastina tisular es una lipoproteína que funciona como cofactor del factor VIIa en la activación proteolítica dependiente de calcio del factor X (39) y del factor IX (40). Se ha sugerido (41) que la parte proteica del factor III sería la responsable de la unión al factor VIIa y del aumento de su actividad catalítica (2 900 veces), mientras que la parte lipídica daría cuenta de la disminución de la constante de Michaelis para el sustrato (10 veces).



- Transformaciones de precursores en especies activas.
- Reacciones clásicas de las vías extrínseca, intrínseca y común.
- Reacciones de retroalimentación positivas.
- Reacciones entre componentes de las vías extrínseca e in trínseca.

Figura 4. Activación en cascada de la coagulación. Reacciones de las vías extrínseca, intrínseca y común e interrelaciones en tre las mismas.

Tabla 2. Factores de la coagulación

<u>Factor</u>	<u>Nombre</u>	<u>Función</u>
Factor I	Fibrinógeno	Sustrato terminal del sistema de coagulación; tras la proteólisis por trombina polimeriza en fibras de fibrina.
Factor II	Protrombina	Zimógeno, dependiente de vitamina K, de la serin-proteasa trombina.
Factor V	Proacelerina	Procofactor no enzimático del factor Xa en el complejo protrombinasa.
Factor VII	Proconvertina	Zimógeno, dependiente de vitamina K, del factor VIIa el cual activa al factor X por la vía extrínseca y al factor IX por la vía intrínseca.
Factor VIII	Factor antihemofílico A	Procofactor no enzimático del factor IXa en el complejo de activación del factor X.
Factor IX	Factor antihemofílico B	Zimógeno, dependiente de vitamina K, del factor IXa, el cual activa al factor X.
Factor X	Factor de Stuart-Prower	Zimógeno, dependiente de vitamina K del factor Xa, la proteasa del complejo protrombinasa.
Factor XI	Antecedente de la tromboplastina plasmática	Zimógeno del factor XIa, el cual convierte el factor IX en factor IXa.
Factor XII	Factor de Hageman	Zimógeno del factor XIIa, el cual activa el factor XI y la prekalicreína.
Factor XIII	Factor estabilizador de fibrina	Zimógeno de una transglutaminasa que entrecruza covalentemente los monómeros de fibrina entre sí.
Prekalicreína	Factor de Fletcher	Zimógeno de la kalicreína, la cual activa al factor XII y rompe el kininógeno-HMW para liberar bradikinina.

Tabla 2. Continuación.

<u>Factor</u>	<u>Nombre</u>	<u>Función</u>
Kininógeno de alto peso molecular (HMW).	Factor de Fitzgerald Williams, Flaoujeac	Cofactor de activación de contacto no enzimático para el factor XIIa y kalicreína

Los factores de coagulación se numeran con números romanos de acuerdo con el orden de su descubrimiento.

Si bien la actividad del complejo factor VII-factor tisular es muy pequeña, parece suficiente para iniciar la activación del factor X (42). A su vez el factor Xa actúa proteolíticamente sobre el factor VII transformándolo en la forma activa, VIIa (43). Asimismo, activan al factor VII la trombina, el factor IXa y el factor XIIa (44). No obstante, no debe ser excluida la posibilidad de que exista alguna proteasa, hasta el momento no identificada que active el factor VII para la iniciación de la vía extrínseca.

El hecho de que las deficiencias de los factores XI, IX u VIII, implicados en la vía intrínseca, estén asociados con desórdenes hemorrágicos indica que la vía intrínseca clásica por sí sola es insuficiente para un mantenimiento adecuado de la hemostasis.

I.4.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca se inicia mediante las reacciones de activación de contacto que tienen como resultado la formación del factor XIa. Estas reacciones se disparan cuando el plasma es expuesto a diversas sustancias cargadas negativamente, como cristal, caolín, celite, cristales de urato, sulfátidos, etc, si bien no se conoce exactamente la naturaleza de la superficie negativa requerida en el proceso fisiológico. A esta superficie se unen el factor XII y los complejos prekalicreína-kininógeno de alto peso molecular (kininógeno-HMW) y factor XI-kininógeno-HMW, a través del kininógeno que actúa como molécula transportadora (Fig. 5).

El factor XII, cuya susceptibilidad a la activación por diversas proteasas se ve muy favorecida tras su unión a una superficie (45), es activado por la kalicreína cercana generándo-

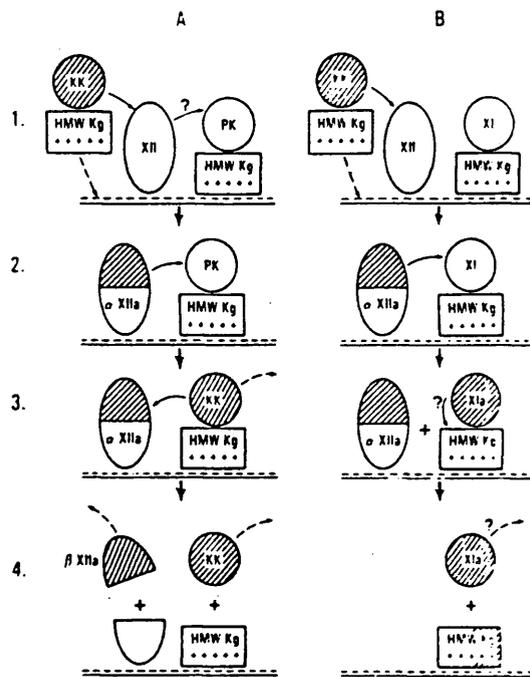


Figura 5. Modelo de las reacciones de activación de contacto. ---- representa la superficie negativamente cargada; HMW-Kg, kininógeno de alto peso molecular; KK, kalicreína plasmática; —→ ataque proteolítico; ---→ tendencia a asociarse con o a disociarse de la superficie. A - Activación de prekalicreína (PK) B - Activación del factor XI. El HMW-Kg en B.4 (parcialmente sombreado) representa HMW-Kg degradado.

se el α -factor XIIa. Este, a su vez, activa la prekalicreína y el factor XI unidos a la superficie a través del kininógeno-HMW. Un nuevo ataque de la kalicreína sobre el α -factor XIIa produce el β -factor XIIa, el cual conserva su actividad proteásica pero carece de las propiedades de unión a superficies del α -factor XIIa, propagando la activación de prekalicreína a la fase líquida (46). Por otra parte, se ha sugerido que el factor XIa puede actuar proteolíticamente sobre el kininógeno-HMW liberándose así de la superficie y siendo de esta forma capaz de actuar sobre el factor IX (47).

A pesar de que la activación recíproca del factor XII y la prekalicreína sobre una superficie en presencia de kininógeno-HMW constituye un modelo muy atractivo, no se conoce realmente cual es el iniciador del proceso. Se ha sugerido un posible papel de las plaquetas activadas en la iniciación de la vía intrínseca de la coagulación. Las plaquetas estimuladas por ADP o colágeno promueven la activación proteolítica del factor XII por el complejo kininógeno-HMW-kalicreína y el factor XIIa así generado es capaz de activar al factor XI. Asimismo, las plaquetas tratadas con colágeno o trombina promueven la activación del factor XI en presencia de kalicreína y kininógeno-HMW pero en ausencia de factor XII, indicando que las plaquetas necesariamente proporcionan una actividad paralela o alternativa a la del factor XII (48, 49). Por otra parte, las plaquetas estimuladas exponen sitios de unión para el kininógeno-HMW (50), el cual parece incluso ser liberado por las mismas plaquetas estimuladas (51).

El factor XIa activa al factor IX en presencia de calcio mediante la ruptura de dos enlaces, liberándose un péptido de activación y generándose el factor IXa. A su vez, el factor IXa cataliza la activación intrínseca del factor X (52) en presencia de calcio, factor VIII:calcio y fosfolípidos negativamen

te cargados. Las plaquetas pudieran proporcionar una superficie adecuada para la activación del factor IX y del factor X.

Una comparación de las constantes cinéticas para la activación del factor X por la vía intrínseca (53) y por la vía extrínseca (54) sugiere que ambas vías tienen una eficiencia catalítica similar, por lo que sus contribuciones reales a la generación del factor Xa dependerán de las concentraciones disponibles de los factores IXa y VIIa y de los sitios de activación fisiológica.

I.4.3. Vía común clásica

La vía común consiste en la activación de protrombina por el factor Xa, la transformación de fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina y el entrecruzamiento de los polímeros de fibrina por el factor XIIIa (Fig. 4).

La activación de la protrombina por el factor Xa tiene lugar en presencia de calcio, fosfolípidos y el factor Va (55). De nuevo las plaquetas son capaces de proporcionar una superficie adecuada para la formación del complejo factor Va-factor Xa (56). Las plaquetas no estimuladas unen coordinadamente los factores Va y Xa en presencia de calcio, actuando el factor Va, al menos en parte, como receptor del factor Xa en la superficie de las plaquetas. En ausencia de factor V exógeno, el factor Xa sólo se une a las plaquetas si éstas han sido previamente activadas por trombina, lo que sugiere una liberación de factor V plaquetario. La asociación de factor Xa y factor V plaquetario puede ser importante para una lenta formación inicial de trombina, de forma que la subsiguiente activación del factor V por la trombina conduzca a un aumento de la unión del factor Xa a la plaqueta y de la actividad protrombinasa.

La trombina así formada se disocia de la superficie y actúa sobre el fibrinógeno liberando los fibrinopéptidos. Los monómeros de fibrina resultantes polimerizan espontáneamente y finalmente son entrecruzados por la acción del factor XIIIa.

I.4.4. Transformación de fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina

En el proceso de formación de fibrina pueden distinguirse tres pasos fundamentalmente:

1 - Activación del fibrinógeno a monómero de fibrina mediante la liberación del fibrinopéptido A por acción de la trombina.

2 - Polimerización de los monómeros de fibrina en protofibrillas.

a - Entrecruzamiento de las cadenas γ por el factor XIIIa - calcio.

b - Liberación del fibrinopéptido B por la trombina.

3 - Asociación lateral de las protofibrillas para constituir la red de fibras de fibrina.

a - Entrecruzamiento de las cadenas α por el factor XIIIa - calcio.

La acción de la trombina sobre el fibrinógeno es altamente específica, ya que cataliza la hidrólisis de dos clases de enlaces Arg-Gly ($A\alpha$ 16-17 y $B\beta$ 14-15) rápidamente y de una tercera ($A\alpha$ 19-20) más lentamente (57). Como consecuencia de la ruptura de los dos primeros tipos de enlaces se liberan los fibrinopéptidos A y B, negativamente cargados de los extremos aminoterminales de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$, respectivamente. La liberación del péptido A, que tiene lugar más rápidamente que la del

péptido B, es suficiente para iniciar la polimerización de la fibrina.

Se han propuesto dos modelos diferentes para explicar la distinta velocidad de liberación de los fibrinopéptidos, el modelo competitivo y el modelo secuencial. Según el mecanismo competitivo, apoyado por datos cinéticos, ambos sitios en las cadenas A α y B β son totalmente accesibles a la trombina y el fibrinopéptido A es liberado más deprisa por presentar una constante cinética mayor. La velocidad de liberación del fibrinopéptido B aumenta al ser eliminado uno o ambos péptidos A, debido a un cambio conformacional inducido en la molécula (58). En el modelo secuencial, la eliminación del fibrinopéptido A es esencial para que el sitio del péptido B se exponga a la trombina y la liberación secuencial de los dos pares de fibrinopéptidos tiene como resultado la activación secuencial de dos clases de sitios de polimerización (59).

La liberación de los fibrinopéptidos A pone al descubierto unos sitios A en el dominio central E de la molécula, complementarios de otros sitios (a) siempre existentes en los dominios terminales D. La interacción de un sitio A de un primer monómero con uno (a) de otra molécula da lugar al solapamiento de dos monómeros de fibrina (60). Esta interacción A(a) es en diversas condiciones mucho más rápida que la propia liberación de los fibrinopéptidos (59), permitiendo la asociación del dominio central de un monómero de fibrina con el dominio D de una molécula de fibrinógeno sin activar.

El hecho de que el tripéptido Gly-Pro-Arg, de secuencia idéntica a la de los tres primeros restos del nuevo extremo aminoterminal de la cadena α , actúe inhibiendo la polimerización de la fibrina, sugiere claramente que este segmento participa en la interacción DE (61). De igual modo, el fragmento D $_1$ de di

gestión del fibrinógeno por plasmina es capaz de interaccionar a través de su cadena γ con los sitios expuestos en el monómero de fibrina, interfiriendo en la polimerización (60). El fragmento D_3 , cuya cadena γ está más degradada, presenta una afinidad mucho menor por los monómeros de fibrina (60).

Se ha propuesto también que el sitio de contacto puede estar localizado en cualquier otra zona del dominio E pero en una conformación de baja afinidad hasta la liberación de los fibrinopéptidos. Por otra parte, la liberación de los dos fibrinopéptidos A reduce el exceso de cargas negativas del dominio central de -8 a -1 . Cuando se liberan los fibrinopéptidos B, el dominio central queda polarizado con un exceso de cargas positivas de $+5$. Cada uno de los dominios terminales posee, sin embargo, una carga negativa de -4 . Ello hace posible que cada dominio terminal establezca una interacción electrostática complementaria con el dominio central de otra molécula, contribuyendo favorablemente a estabilizar el solapamiento de los monómeros de fibrina (62).

La unión de un tercer monómero de fibrina, por interacción de su sitio (a) en el dominio terminal con el segundo sitio A en el dominio central del primer monómero hace que los dominios terminales D de dos monómeros se dispongan adyacentes y proporcionen una importante interacción para el entrecruzamiento γ - γ por el factor XIIIa (Fig. 6) (63). De esta forma se inicia el crecimiento de la protofibrilla de dos moléculas de grosor en ambas direcciones.

Cuando las protofibrillas alcanzan una longitud suficiente, del orden de 600-800 nm (64), se inicia el proceso de asociación lateral en fibras más gruesas, de aproximadamente 1 μ m de diámetro. En esta asociación se ve implicada una nueva interacción entre dominios D lateral, que es bastante más débil que

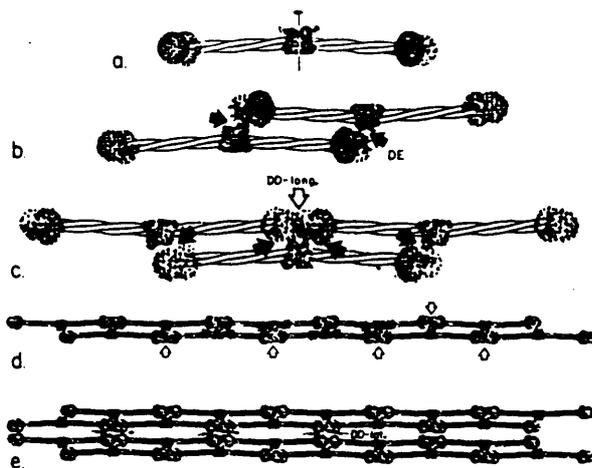


Figura 6. Representación esquemática del proceso de polimerización de la fibrina. a) Fibrinógeno. b) Dímero de fibrina en el que se señalan las dos interacciones DE. c) Trímero de fibrina formado por la adición de un tercer monómero originándose interacciones DD longitudinales. d) Protofibrilla formada por asociaciones continuadas de monómeros y oligómeros mediante interacciones DE y DD longitudinales e) Posible ordenación de las protofibrillas en las fibras de fibrina, estabilizadas por los contactos DD laterales.

el solapamiento DE anteriormente descrito (65). La liberación de los fibrinopéptidos B tiene lugar preferentemente sobre las protofibrillas y contribuye a estabilizar la asociación lateral de las mismas. Se ha propuesto que la liberación de los fibrinopéptidos B puede poner al descubierto un segundo par de sitios en el dominio central que interaccionen con otros complementarios en los dominios terminales, permitiendo la generación de fibras más gruesas (59).

La continua asociación lateral de largas protofibrillas y fibras entre sí tiene como resultado la formación de una red tridimensional o gel de fibrina insoluble. El crecimiento de las fibras individuales viene determinado cinéticamente por la velocidad de asociación de las mismas, ya que la formación de conexiones entre las fibras previene la formación de más contactos DD laterales entre las protofibrillas (64,66).

Aunque las interacciones no covalentes por sí solas proporcionan una fortaleza mecánica considerable a la red de fibrina, la formación de enlaces γ - γ y polímeros de cadena α por acción del factor XIIIa aumenta aún más la rigidez y estabilidad del gel (67). Por otra parte, la mera agregación de la fibrina es insuficiente para un mantenimiento adecuado de la hemostasis. La importancia del entrecruzamiento covalente de las cadenas γ se pone de manifiesto en deficiencias hereditarias del factor XIII o en pacientes que contienen en plasma inhibidores adquiridos de la estabilización de fibrina, los cuales presentan, en general, graves tendencias hemorrágicas (68).

El factor XIII es una molécula tetramérica compuesta por dos cadenas a- y dos cadenas b- (a_2b_2) unidas entre sí por fuerzas no covalentes. Su activación tiene lugar en varios pasos (69). La trombina actúa primero separando un pequeño péptido de

activación de las cadenas α -, con lo que se forma un intermedio inactivo $\alpha'_2\beta_2$. En presencia de calcio, las cadenas β_2 se disocian de este complejo y se expone el grupo cisteína del centro activo presente en las cadenas α -, generándose la enzima activa α''_2 . En ausencia de fibrinógeno se necesitan concentraciones de calcio excesivamente altas para que se de este paso pero a concentraciones normales de fibrinógeno son suficientes los niveles plasmáticos de calcio.

El factor XIIIa es una endo- γ -glutamin: ϵ -lisin transferasa, es decir, cataliza la formación de enlaces amido entre el grupo γ -carboxilo de una glutamina y el grupo ϵ -amino de una lisina (70). La reacción de entrecruzamiento es altamente específica ya que sólo intervienen ciertos restos glutamina y lisina. Se forman de 4 a 6 enlaces por molécula de fibrina estabilizada: 2 entre las cadenas γ de monómeros adyacentes, constituyéndose dímeros γ y de 2 a 4 entre cadenas α , constituyéndose polímeros α de alto peso molecular.

El entrecruzamiento de las cadenas γ tiene lugar en sus extremos carboxiterminales. La glutamina 397 de una cadena γ se une a la lisina 405 de la otra y viceversa, de forma antiparalela (71). El fibrinógeno también puede ser sustrato del factor XIIIa, si bien con mucha menor afinidad que la fibrina (72). En base a recientes estudios de microscopía electrónica, se ha sugerido que la liberación de los fibrinopéptidos del dominio central de la molécula de fibrinógeno puede contribuir a desenmascarar los sitios de entrecruzamiento en los dominios distales D (23,73).

El entrecruzamiento de las cadenas α es más lento y bastante más complejo, ya que cada cadena α puede unirse a, al menos, otras dos. Los restos de glutamina implicados están localizados en el apéndice libre carboxiterminal de la cadena α (restos 328, 366 y, posiblemente también, 237) (5,74), mientras que

los restos lisina no han sido identificados. Tampoco se conoce la orientación de las cadenas en el polímero, constituido por, al menos, 5 ó 6 cadenas.

Los restos glutamina de las cadenas α pueden intervenir también en el entrecruzamiento con otras proteínas como la fibronectina (75,76).

I.5. DEGRADACION DE LA FIBRINA POR PLASMINA

La fibrina tramada es susceptible al ataque por plasmina en los mismos sitios que el fibrinógeno y en el mismo orden: ataque a los extremos carboxiterminales de las cadenas α , ruptura de las tres cadenas entre los dominios central y terminal y ataque a las cadenas γ cerca del sitio de entrecruzamiento. El entrecruzamiento γ - γ da lugar a la formación de dímeros DD como productos terminales de la degradación por plasmina (77), los cuales, en condiciones fisiológicas, se encuentran unidos de forma no covalente a un fragmento E de otro monómero en la protofibrilla (78).

Se distinguen 4 fases en la degradación por plasmina de la fibrina tramada (79). En la fase 1, que afecta fundamentalmente a los polímeros α , todos los dominios D y E se encuentran unidos covalentemente a alguna parte de la matriz. La fibrina en esta fase está constituida por polímeros α de alto peso molecular, cadenas β y dímeros γ - γ intactos y una pequeña proporción de cadenas degradadas β' y γ' - γ . Aunque el coágulo de fibrina vaya haciéndose más pequeño durante su exposición a la plasmina, la composición polipeptídica del mismo permanece inalterable.

En la fase 2, algunos fragmentos se encuentran retenidos en la matriz de fibrina mediante sus uniones no covalentes a

la hebra complementaria en la protofibrilla, por lo que pueden ser solubilizados utilizando detergentes iónicos, como el SDS. Estos fragmentos son de muy alto peso molecular, por encima de 500 000 Da, y ya sólo contienen restos de la red de polímeros α . Un ulterior ataque de la plasmina en la hebra complementaria tiene como resultado la liberación espontánea de la matriz de complejos solubles (fase 3) (Fig. 7), compuestos por fragmentos de pesos moleculares 195 000 a 800 000 Da unidos entre sí por enlaces no covalentes. La liberación de estos complejos deja atrás un coágulo más pequeño en el que se hacen accesibles al ataque por la plasmina zonas que anteriormente no se encontraban expuestas.

Se ha postulado (80) que la ulterior degradación de los complejos en solución es un proceso que ocurre fundamentalmente "in vitro" ya que "in vivo" se encuentra limitado por la entrada de los derivados en el torrente sanguíneo y la inhibición de la degradación por la α_2 -antiplasmina. "In vitro" la exposición continuada a la plasmina de los complejos solubilizados tiene como resultado su degradación progresiva a fragmentos más pequeños (fase 4), hasta llegar a las formas terminales DD, E y el complejo DD/E.

I.6. ESTRUCTURA DEL PLASMINOGENO Y LA PLASMINA

El paso central del sistema fibrinolítico es la conversión de la proenzima plasminógeno en la enzima activa plasmina, una serín-proteasa con especificidad tipo tripsina.

El plasminógeno es una glicoproteína de 90 000 Da de peso molecular formada por una única cadena polipeptídica de 790 aminoácidos cuya estructura primaria ha sido totalmente determinada (Fig. 8) (81). Existen en el plasma dos variantes del plasminógeno con distinto contenido en carbohidrato: el plasm

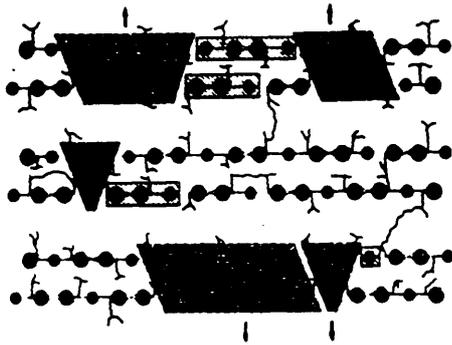


Figura 7. Formación "in situ" de los fragmentos (parcialmente sombreados) y complejos (intensamente sombreados) de digestión de fibrina tramada por plasmina. Se representan tres protofibrillas asociadas lateralmente. Los complejos son porciones de ambas hebras de una protofibrilla dada que han sido liberadas de sus uniones covalentes por lo que pueden separarse espontáneamente de la fibrina. Los fragmentos son derivados de una sola hebra de la protofibrilla que se mantienen unidos mediante uniones no covalentes a otras partes de la fibrina y que pueden ser separados de la misma con SDS. La ulterior degradación de la hebra complementaria en la protofibrilla convierte a estos fragmentos en complejos.


```

      5      10      15      20      25      30
1  E P L D D Y V N T Q G A S L F S V T K K Q L G A G S I E E C
31 A A K C E E D E E F T C R A F E O Y H S K E O E C V I M A E N
61 R K S S I I R M R D V V L F E K K V Y L S E C K T G D G K N
91 Y R G T M S K T K M G I T C Q K W S S T S P H R P R F S P A
121 T H P S E G L E E N Y C R N P D N D P O G P W C Y T I D R E
151 K R Y D Y C D I L E C E E E C M H C S G E M Y D G K I S K T
181 M S G L E C C O A W D S Q S P H A M G Y I P S K F P N K M L K
211 K N Y C R N P D R E L R P W C F T T D P M K R R W E L C D I P
241 R C T T P P P S S G P T Y O C L K G T G E N Y R G N V A V T
271 V S C H T C O M W S A O T P H T H N R T P E N F P C K N L D
301 E N Y C R N P D G K R A P W C H T T N S O V R W E Y C K I P
331 S C D S S P V S T E E L A P T A P P E L T P V V Q D C Y H G
361 D G Q S Y R G T S S T T T T G K K C Q S M S S M T P H R H Q
391 K T P E N Y P M A G L T M N Y C R N P D A D K G P W C F T T
421 D P S V R W E Y C N L K K C S G T E A S V V A P P P V V L L
451 P N V E T P S E E D C M F G N G K G Y R G K R A T T V T G T
481 P C Q D W A A O E P H R H S I F T P E T M P R A G L E K N Y
511 C R N P D G D V G G P W C Y T T N P R K L Y D Y C D V P O C
541 A A P S F D C G K P O V E P K K C P G R V V G G C V A M P H
571 S W P W O V S L R T R F G M H F C G G T L I S P E W V L T A
601 A H C L E K S P R P S S Y K V I L G A H O E V N L E P H V Q
631 E I E V S R L F L E P T R K D I A L L K L S S P A V I T D K
661 V I P A C L P S P N Y V V A D R T E C F I T G W G E T O G T
691 F G A G L L K E A Q L P V I E N K V C M R Y E F L N G R V C
721 S T E L C A G M L A G C T D S C Q G D S G G P L V C F E K D
751 K Y I L Q G V T S W G L G C A R P N K P G V Y V R V S R F V
781 T W I E G V H R N N

```

Figura 8. Secuencia de aminoácidos del plasminógeno humano.

Las cadenas de carbohidrato se unen en las posiciones Asn₂₈₈ (plasminógeno-1) y Thr₃₄₅ (plasminógeno-1 y plasminógeno-2). Los enlaces disulfuro unen los restos 30-54, 34-42, 104-144, 132-156, 186-225, 214-237, 168-296, 276-315, 304-327, 357-434, 378-417, 406-429, 461-540, 482-523, 511-535, 547-665, 557-565, 587-603, 709-725, y, posiblemente, 83-161, 165-242, 255-332, 679-746 y 736-764.

Las cinco regiones que constituyen los bucles comprenden los restos 83-161, 165-242, 255-332, 357-434, y 461-540.

Los restos His₆₀₂, Ser₇₄₀ y Asp₆₄₅ constituyen el centro activo.

La activación a plasmina implica la ruptura del enlace Arg₅₆₀-Val₅₆₁ seguida de la eliminación de los restos 1-76.

por puentes disulfuro (81). Los cinco bucles comprenden cada uno alrededor de 78 aminoácidos y constituyen dominios de aproximadamente 10 000 Da (Fig. 8 y 9). Por proteólisis limitada del Glu-plasminógeno con elastasa se obtienen tres fragmentos (81). El fragmento K1-3 comprende los tres primeros bucles y puede aislarse en dos versiones: Tyr₇₉-Val₃₃₇ ó Tyr₇₉-Val₃₅₃. El segundo fragmento, K4, se corresponde con el cuarto bucle y comprende los restos Val₃₅₄-Ala₄₃₉. El último fragmento, denominado miniplasminógeno, incluye los aminoácidos Val₄₄₂-Asn₇₉₀ y consiste en el quinto bucle y la región carboxiterminal de la molécula de plasminógeno. Este miniplasminógeno puede ser activado del mismo modo que el plasminógeno formando miniplasmina (94).

Estos fragmentos han sido extensamente utilizados con objeto de asignar las diversas funciones del plasminógeno y la plasmina a las diferentes regiones de la molécula. Una de las propiedades más importantes del plasminógeno /plasmina es su capacidad para interactuar con aminoácidos tales como la lisina, sus análogos, ácido ϵ -aminocaproico (ϵ -ACA) y ácido trans-4-(aminometil)ciclohexano-1-carboxílico, todos los cuales tienen actividad antifibrinolítica (95,96). El Glu-plasminógeno posee dos clases de sitios de unión para ϵ -ACA: un sitio de alta afinidad, presumiblemente en el fragmento K1 (97), con una constante de disociación de aproximadamente 9 μ M (90), y 4-5 sitios de baja afinidad, presumiblemente en los bucles 1-4 (97), con un K_D de 5 mM (90).

La unión de ácidos ω -aminocarboxílicos al Glu-plasminógeno no induce un cambio conformacional en la molécula similar al producido por la pérdida del péptido Glu₁-Lys₇₆ aminoterminal (86, 88, 89) y que conduce igualmente a un incremento de la velocidad de activación (88-90, 92). Por otra parte, estos sitios de unión a lisina son los responsables de la interacción del

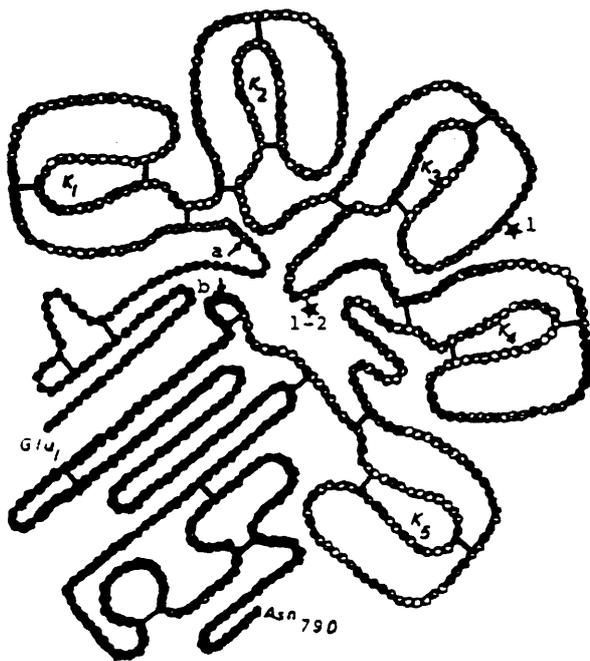
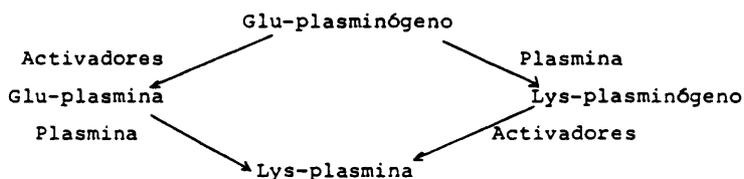


Figura 9. Estructura del plasminógeno en la que se representan las cinco regiones en bucle (K_1-K_5). Las flechas indican el sitio de ataque de la plasmina en el paso de la forma Glu a la forma Lys (a) y el sitio de ataque de los activadores de plasminógeno a plasmina (b). Las estrellas señalan la posición de las cadenas de carbohidrato: Asp₂₈₈ (1) y Thr₃₄₅ (1-2).

plasminógeno/plasmina con el fibrinógeno/fibrina (98, 99) y la α_2 -antiplasmina (100). Asimismo, esta propiedad del plasminógeno es la que permite su aislamiento directo del plasma por cromatografía de afinidad en lisina inmovilizada (101).

La activación del plasminógeno a plasmina por todos los activadores conocidos tiene lugar mediante la ruptura del enlace peptídico entre la Arg₅₆₀ y la Val₅₆₁ (102). La plasmina generada tiene capacidad para catalizar la ruptura del enlace peptídico Lys₇₆-Lys₇₇ tanto de la plasmina, generándose la plasmina final (Lys-plasmina), como del Glu-plasminógeno remanente, formando Lys-plasminógeno (103):



Si la activación del Glu-plasminógeno se lleva a cabo en presencia de un inhibidor de la plasmina, se obtiene Glu-plasmina como producto final (103, 104). En cualquier caso, la ruptura del enlace Arg-Val, esencial para la expresión de la actividad catalítica, hace que la molécula de plasmina esté constituida por dos cadenas polipeptídicas, una pesada y otra ligera, conectadas por dos puentes disulfuro: Cys₅₅₇-Cys₅₆₅ y Cys₅₄₇-Cys₆₆₅ (Fig. 9). La cadena pesada, de 58 000-63 000 Da de peso molecular (103) comprende las cinco regiones homólogas en forma de bucles presentes en la molécula de plasminógeno. Así, la interacción de Lys-plasmina con columnas de lisina-Sepharosa es virtualmente idéntica a la del Lys-plasminógeno (105), indicando que los sitios de unión de lisina del Lys-plasminógeno se conservan en la Lys-plasmina. Por su parte, la cadena ligera, con un peso molecular de 23 000-26 000 Da (102,103) contiene

los restos activos serina (Ser₇₄₁) (106) e histidina (His₆₀₂) (107) constituyentes del centro activo de la plasmina, homólogo en secuencia al de la tripsina y otras serín-proteasas.

La plasmina no sólo es activa en la fibrinólisis y fibrinogenólisis sino que también es capaz de activar diversos zimógenos del complemento, C1 (108), C3 (109) y C5 (110), así como de inactivar al inhibidor de C1 (111). Asimismo, actúa digiriendo al factor XIIa (112), factor V, factor VIII (113), ACTH, glucagón (114) y γ -globulina (115). Con respecto a sus sustratos no fisiológicos, la plasmina posee especificidad tipo tripsina, es decir, hidroliza proteínas y péptidos en los enlaces de lisinas y argininas (116). La plasmina posee actividad esterolítica hacia ésteres de aminoácidos básicos y actividad amidolítica hacia amidas de aminoácidos básicos (117, 118).

I.7. ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO

El plasminógeno puede ser activado a plasmina por agentes intrínsecos, extrínsecos o exógenos (generalmente terapéuticos).

I.7.1. Activación intrínseca

La activación intrínseca, al igual que ocurriera en la vía intrínseca de la coagulación, parece estar mediada por las reacciones de activación de contacto del factor XII (Fig. 5). Esta hipótesis está basada en la observación de que plasma normal incubado con una superficie activante como el caolín desarrolle actividad fibrinolítica (119, 120), mientras que en plasmas deficientes de factor XII (121), prekalicreína (122) o kininógeno de alto peso molecular (123) no se da esta activación de la fibrinólisis.

Esta vía intrínseca es muy poco conocida y no se sabe con exactitud cuales son las moléculas que intervienen en el proceso. Se ha sugerido que la kalicreína pudiera ser un activador directo del plasminógeno (124), si bien pudiera existir un primer activador adicional (125).

I.7.2. Activación extrínseca

Se han encontrado activadores del plasminógeno en muchos tejidos y secreciones. Una disminución de la síntesis o secreción de los mismos desde las paredes de los vasos sanguíneos está asociada con trombosis venosas recurrentes y deposición de fibrina. Estos activadores, que sólo recientemente han empezado a ser purificados y caracterizados, son los responsables de la activación extrínseca del plasminógeno.

I.7.2.1. Uroquinasa. Prouroquinasa

Aunque originalmente se hubiera caracterizado como un activador exógeno (encontrado en orina) (126,127), recientemente se ha comprobado que la uroquinasa es un activador endógeno producido en el sistema vascular (128) y que se halla en el plasma (129).

La uroquinasa, una serín-proteasa del tipo tripsina, es sintetizada en forma de un precursor de cadena sencilla denominado prouroquinasa. Este precursor, de 411 aminoácidos y 54 000 Da de peso molecular, es convertido en la forma totalmente activa mediante la ruptura del enlace $\text{Lys}_{158}-\text{Ile}_{159}$ (130) que es catalizada por la plasmina (131-133). No se sabe, sin embargo, si la plasmina es el activador natural de la prouroquinasa o si existe un activador específico. La prouroquinasa es prácticamente inactiva hacia los sustratos sintéticos pequeños (134,135) tal y como era de esperar para el precursor de una serín-proteasa.

sa. Sin embargo, recientemente Lijnen et al. (136) han comprobado que la prouroquinasa en sí misma es un potente activador del plasminógeno. Ello parece ser debido al hecho, único entre las serín-proteasas, de que la proenzima forme un intermedio activo del tipo Michaelis-Menten con su sustrato.

La uroquinasa puede ser aislada de orina o de cultivos celulares de riñón humano. Se han descrito dos formas de la uroquinasa de diferente peso molecular: la uroquinasa de alto peso molecular (HMW-uroquinasa) de 53 000-54 700 Da (127, 137) y la uroquinasa de bajo peso molecular (LMW-uroquinasa) de 30 000-34 500 Da (127, 138-141). Dependiendo de los métodos preparativos utilizados se obtiene una de ellas o la mezcla de ambas formas. La LMW-uroquinasa parece tratarse de un producto de degradación proteolítica relativamente estable de la HMW-uroquinasa (138,142). A pesar de ello, las actividades específicas de ambas formas de la uroquinasa calculadas como actividades molares son prácticamente idénticas (138).

La HMW-uroquinasa consiste en dos cadenas polipeptídicas (138, 143) conectadas por un único puente disulfuro (143). La cadena pesada, con un peso molecular de 31 000 Da y 253 aminoácidos, contiene el centro activo de la molécula (138, 143), mientras que la cadena ligera, de 23 000 Da de peso molecular (143), exhibe una gran homología con las estructuras en bucle del plasminógeno. Por ataque de la plasmina en la posición Lys₁₃₅-Lys₁₃₆ de la cadena ligera se libera la estructura en bucle y la región aminoterminal de la misma quedando solamente un péptido de 21 aminoácidos y 2 426 Da de peso molecular unido a la cadena pesada, siendo ésta precisamente la composición de la LMW-uroquinasa.

Mientras que la prouroquinasa es capaz de unirse a la fibrina con una gran afinidad, no ocurre así con la uroquinasa en ninguna de sus formas, lo que indica que la fibrinoespecifici-

dad se pierde simplemente con la ruptura del enlace Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ en la activación de la prouroquinasa (144).

La uroquinasa actúa sobre el Glu-plasminógeno rompiendo el enlace Arg₅₆₀-Val₅₆₁ y formando Glu-plasmina. Esta forma de plasmina autocataliza la ruptura del enlace Lys₇₆-Lys₇₇ en la cadena pesada de la Glu-plasmina con lo que se forma Lys-plasmina. Asimismo, tanto la Glu-plasmina como la Lys-plasmina son capaces de catalizar la ruptura del enlace Lys₇₆-Lys₇₇ en el Glu-plasminógeno remanente, transformándolo en Lys-plasminógeno el cual es rápidamente activado (145, 146). La uroquinasa no cataliza la ruptura de este enlace peptídico ni en el Glu-plasminógeno ni en la Glu-plasmina o, al menos, no lo hace a una velocidad lo suficientemente apreciable como para que se vea implicada en este aspecto del mecanismo molecular (103).

I.7.2.2. Activador tisular

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) ha sido aislado de útero humano (147), si bien se encuentra en diversos órganos (148). Asimismo, puede ser aislado en grandes cantidades de un cultivo de células tumorales malignas (Bowes, RPM1-7272) siendo este activador muy similar o prácticamente idéntico al t-PA procedente de útero (149). Por otra parte, el clonaje del gen del t-PA humano ha permitido la obtención de t-PA recombinante cuyas propiedades bioquímicas, biológicas y trombolíticas son indistinguibles de las del t-PA natural (150,151).

El t-PA natural es una serín-proteasa con un peso molecular de aproximadamente 70 000 Da. Está compuesto por una sola cadena polipeptídica de 527 aminoácidos, que contiene 35 restos cisteína y 4 sitios de posible N-glicosilación (Asn₁₁₈, 186, 218 y 448) (150). Por hidrólisis del enlace Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ por acción de la plasmina la molécula se convierte en un activador de dos cadenas polipeptídicas unidas por un único puente disul-

furo (151). La ruptura de este enlace, aunque no afecta a la actividad sobre el plasminógeno, tiene como resultado un aumento de la actividad amidolítica, lo que ha sido utilizado como test para determinar la proporción existente entre las formas de 1 y 2 cadenas. La cadena pesada, de 37 000-40 000 Da, procede de la parte aminoterminal de la molécula y presenta un pequeño grado de heterogeneidad, posiblemente debido a diferencias en el contenido en carbohidrato o a ligeras modificaciones proteolíticas del extremo aminoterminal (150, 152). Esta cadena contiene dos estructuras en bucle, homólogas a las presentes en la uroquinasa y el plasminógeno. La cadena ligera, de 28 000-33 000 Da, comprende la región carboxiterminal de la proteína y en ella se localiza el centro activo, formado por los restos His₃₂₂, Asp₃₇₁ y Ser₄₇₈. La secuencia de aminoácidos que rodea a estos restos presenta un alto grado de homología con las zonas correspondientes de otras serín-proteasas (150). Ambas cadenas, pesada y ligera, contienen carbohidrato (150).

El t-PA presenta una gran afinidad por la fibrina. Se ha propuesto que la región del t-PA responsable de esta unión a la fibrina es la que comprende los 43 restos aminoterminales de la molécula (153). En la superficie de la fibrina, el t-PA de 1 cadena polipeptídica es rápidamente convertido en la forma de 2 cadenas durante la fibrinólisis, aunque no existe ninguna evidencia de que esta conversión juegue algún papel en la regulación de la fibrinólisis (154). Por otra parte, el t-PA es relativamente inactivo en ausencia de fibrina mientras que en su presencia se acrecienta considerablemente la velocidad de activación del plasminógeno por el t-PA (155). Este hecho es debido a un aumento de la afinidad del t-PA unido a la fibrina por el plasminógeno y no a una modificación de la eficacia catalítica de la enzima. Los datos cinéticos obtenidos por Hoylaerts et al. (155) apoyan un mecanismo según el cual el t-PA y el plasminóge

no se unirían a la fibrina de un modo secuencial, dando lugar a un complejo ternario cíclico.

I.7.3. Activación exógena

Se entiende por activación exógena del plasminógeno aquella que es producida por componentes añadidos al plasma, generalmente con fines terapéuticos, como son la uroquinasa y la estreptoquinasa, si bien, como ya hemos indicado anteriormente, recientemente se ha comprobado que la uroquinasa es un activador endógeno (128,129).

I.7.3.1. Estreptoquinasa

La estreptoquinasa es el agente trombolítico más ampliamente utilizado ya que es barato y fácil de obtener. Se trata de un producto catabólico secundario de estreptococos β -hemolíticos que, a pesar de no poseer actividad proteolítica, estereolítica o amidolítica, es capaz de activar el plasminógeno. Toda vía no se ha encontrado ningún sustrato sintético para la estreptoquinasa y, por otra parte, tampoco es capaz de activar el plasminógeno de todas las especies; los únicos sustratos conocidos para la estreptoquinasa son los plasminógenos de mono (156, 157), mandril (156), chimpancé (156), gato (157), perro (157), conejo (157) y el plasminógeno humano (158).

La estreptoquinasa es una proteína compuesta por una sola cadena polipeptídica de 45 000-50 000 Da de peso molecular (159, 160), que no contiene carbohidratos ni lípidos (159, 160). Tampoco hay cisteínas o cistinas presentes en la molécula (159, 160). El análisis de la estructura por difracción circular indica que la estreptoquinasa tiene un contenido helicoidal del orden del 10-12% (160).

Basándose en los estudios realizados por diferentes gru-

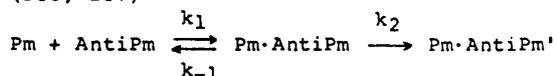
gresivo incremento de la capacidad de activación de plasminógeno, alcanzándose un máximo de esta actividad a concentraciones equimoleculares de estreptoquinasa y Lys-plasmina (162).

1.8. INHIBIDORES DE PLASMINA

Los principales inhibidores de la plasmina en el plasma son la α_2 -antiplasmina y la α_2 -macroglobulina. La α_2 -antiplasmina es el inhibidor más rápido e importante, mientras que la α_2 -macroglobulina es un inhibidor secundario y más lento, que actúa inhibiendo la plasmina formada en exceso, por encima de la capacidad de la α_2 -antiplasmina.

1.8.1. α_2 -antiplasmina

La α_2 -antiplasmina es una glicoproteína de peso molecular 70 000 Da, compuesta por una sola cadena polipeptídica y que contiene aproximadamente un 13% de carbohidrato (163, 164). Plasmina y α_2 -antiplasmina forman un complejo de estequiometría 1:1 (peso molecular 150 000 Da) muy estable y carente de actividad proteásica o esterásica (163-165). La formación del complejo implica una fuerte interacción entre la cadena ligera de la plasmina y el inhibidor. La reacción tiene lugar en, al menos, dos pasos: una reacción de segundo orden muy rápida y reversible seguida de una reacción de primer orden más lenta e irreversible (166, 167)



La velocidad de la reacción ($k_1 = 2-4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), una de las más rápidas hasta ahora descritas en interacciones proteína-proteína, es altamente dependiente de la disponibilidad de sitios de

unión de lisina libres y del sitio activo libre en la molécula de plasmina (166,168). Se ha sugerido que el complejo se forma por el ataque de la plasmina a un enlace peptídico Leu-Met específico en la región carboxiterminal de la α_2 -antiplasmina, liberándose un péptido de 8 000 Da y formándose un fuerte enlace entre la serina del centro activo de la plasmina y el grupo carbonilo de este resto de leucina específico en el inhibidor (169).

La α_2 -antiplasmina interacciona también débilmente con Glu-plasminógeno y más favorablemente con Lys-plasminógeno, siendo la interacción con este último similar a la que tiene lugar con plasmina cuyo centro activo ha sido bloqueado (170). Por otra parte, se ha observado que fibrina y α_2 -antiplasmina se unen a los mismos sitios en la molécula de plasminógeno/plasmina (168).

I.9. MECANISMO DE LA FIBRINOLISIS

A pesar de poseer una amplia especificidad tipo tripsina, la plasmina "in vivo" no ataca a otras proteínas del plasma, ni siquiera al fibrinógeno que es el precursor soluble de su principal sustrato, la fibrina. Para explicar este hecho durante un cierto número de años se han barajado fundamentalmente tres teorías sobre el mecanismo de la fibrinólisis.

Alkjaersig et al. (171) sugirieron que el plasminógeno se une a la fibrina en formación y es convertido en la enzima activa por los activadores que difunden posteriormente al interior del coágulo. La plasmina así formada ejerce su acción en un entorno relativamente libre de inhibidores.

Ambrus y Markus (172), por su parte, propusieron que los complejos plasmina-inhibidor formados en la circulación se disociarían en presencia de la fibrina, debido a una mayor afinidad

de la plasmina por la fibrina que por sus inhibidores.

Finalmente, Chesterman et al. (173) han sugerido que son los activadores los que se unen selectivamente a la fibrina y transforman en plasmina el plasminógeno que difunde al interior del trombo.

Recientemente, Wiman y Collen (174) han propuesto un modelo unificado basado en las interacciones específicas existentes entre los diferentes componentes del sistema fibrinolítico. Por una parte, el plasminógeno interacciona específicamente, aunque débilmente, con la fibrina a través de sus sitios de unión de lisina (93, 175, 176): en coágulos de plasma repetidamente lavados solamente un 4% del plasminógeno presente en plasma permanece específicamente unido a la fibrina (175). Asimismo el Glu-plasminógeno interacciona débilmente con la α_2 -antiplasmina a través de los sitios de unión a lisina ($K_D = 4 \mu M$) (170), de forma que, de acuerdo con las concentraciones de ambos en el plasma (1 μM de α_2 -antiplasmina y 1.5-2.0 μM de plasminógeno), aproximadamente el 15-20% del plasminógeno se encuentra unido a la α_2 -antiplasmina. La α_2 -antiplasmina reacciona muy rápidamente con la plasmina libre en el plasma; sin embargo, la plasmina que está degradando activamente a la fibrina es inactivada mucho más lentamente por la α_2 -antiplasmina, ya que, tanto su centro activo como sus sitios de unión de lisina se encuentran protegidos del inhibidor (166-168). Por otra parte, los activadores del plasminógeno presentes en la sangre, el endotelio vascular o los tejidos muestran una gran afinidad por la fibrina y, mientras en un sistema purificado activan pobremente al plasminógeno, en presencia de fibrina su eficacia se ve considerablemente incrementada (155).

De esta forma, el activador y el plasminógeno se unen secuencialmente a la fibrina en formación. La fibrina aumenta la concentración local de plasminógeno al crear una interacción

adicional entre el activador y su sustrato a través de un puente de fibrina. La activación del plasminógeno en estas condiciones se ve muy favorecida y la plasmina así formada, unida a la fibrina, está protegida de la rápida acción de los inhibidores (174).

I.10. LECTINAS: PROPIEDADES Y APLICACIONES

La existencia de proteínas, principalmente procedentes de plantas, que interaccionan específicamente con azúcares y aglutinan células, es conocida desde hace casi un siglo. La primera demostración de que tales aglutininas son específicas para azúcares la realizaron Sumner y Howell en 1936 (177), quienes mostraron que la concanavalina A, la lectina aislada de *Canavalia ensiformis*, precipita glucógeno y almidón en solución y que su actividad hemaglutinante se ve inhibida por sacarosa. A finales de la década de los 40, Boyd y Reguera (178) descubrieron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para determinados grupos sanguíneos en el hombre. Posteriormente, Watkins y Morgan en 1952 (179) proporcionaron la primera evidencia de que los carbohidratos son determinantes de la especificidad de grupos sanguíneos. En la actualidad se utilizan comúnmente diversas lectinas en la tipificación de grupos sanguíneos.

La aplicación de las lectinas al estudio de la biología de los carbohidratos comenzó a adquirir importancia a finales de los 60, al demostrarse que la unión de ciertas lectinas, como la concanavalina A, a los carbohidratos presentes en la superficie de los linfocitos produce estimulación mitogénica de los mismos (180) y que las lectinas reaccionan de modo diferente con células normales y malignas (181, 182). Desde entonces, las lectinas se utilizan en el estudio de carbohidratos de superficies celulares y, especialmente, de los cambios que estos

carbohidratos experimentan durante el crecimiento celular, la diferenciación y la malignidad.

Por otra parte, las lectinas son excelentes herramientas para la detección, aislamiento y caracterización estructural de glicoproteínas, especialmente glicoproteínas de membrana, y glicopéptidos.

Los primeros estudios parecían indicar que las lectinas estaban limitadas a las plantas. Sin embargo, actualmente están siendo aisladas en número creciente de animales y microorganismos. No obstante, las plantas y en particular las semillas son todavía la principal fuente de estas proteínas. Por otra parte, las lectinas procedentes de plantas son las únicas extensivamente utilizadas en diversos laboratorios (amplias revisiones en las referencias 183 y 184), como es el caso de la lectina de *Canavalia ensiformis* y la lectina de *Lens culinaris*.

I.10.1. Concanavalina A

La concanavalina A, procedente de *Canavalia ensiformis*, es una de las lectinas más ampliamente utilizadas ya que puede obtenerse fácilmente y de una forma homogénea y su estructura y especificidad han sido extensamente estudiadas. Posee actividad aglutinante de eritrocitos y otros tipos de células (185), es capaz de diferenciar entre células normales y células transformadas (186) y también de precipitar diversos polisacáridos (187-189). La concanavalina A es mitogénica para los linfocitos (190,191) y su unión a la superficie de los mismos tiene como resultado una modificación de la movilidad y distribución de diversas moléculas de la superficie celular (192,193).

A pH fisiológico, la concanavalina A existe predominantemente en forma de tetrámero, de peso molecular 110 000 Da, mientras que por debajo de pH 5.5 la forma que predomina es el díme

ro, de peso molecular 55 000 (194). Asimismo, la derivatización química de la concanavalina A tetramérica con anhídrido acético o anhídrido succínico convierte a la proteína en una molécula dimérica, sin alterar su especificidad de unión a carbohidratos (195). Por otra parte, en condiciones alcalinas se produce la formación de agregados de alto peso molecular (coeficiente de sedimentación 11.35 S) (196). La actividad de aglutinación o precipitación es máxima a pH 6-7 y se ve muy disminuida en los derivados acetilados o succinilados (195), lo que sugiere que estas reacciones que implican agregación están mediadas por la forma tetramérica de la concanavalina A.

El monómero de concanavalina A está constituido por una sola cadena polipeptídica de 237 aminoácidos (peso molecular 27 500) que no contiene ningún puente disulfuro ni cisteína libre y solamente contiene 2 metioninas (197). El aminoácido predominante, la serina, representa el 13.1% del total de aminoácidos. La composición de aminoácidos indica que, independientemente del estado de ionización de las histidinas, el número de grupos negativamente cargados supera a los cargados positivamente a pH fisiológico. Al contrario que la mayoría de las lectinas, la concanavalina A no contiene carbohidrato unido covalentemente (198). Además de las cadenas intactas se observan hasta 3-4 fragmentos diferentes cuyos pesos moleculares varían desde 13 000 hasta 18 000 Da y que son posiblemente el resultado de la proteólisis de la cadena de 27 500 Da de la concanavalina A.

La cadena polipeptídica se pliega en una estructura compacta elipsoidal, de dimensiones aproximadas 40 x 39 x 42 Å, en la que más de la mitad de los aminoácidos se encuentran constituyendo dos grandes láminas β antiparalelas y el resto se ordenan al azar (200). La superficie molecular es relativamente lisa y uniforme y sólo se ve interrumpida por una gran cavidad

que se extiende hacia el interior del protómero. Esta cavidad contiene dos subsitios con diferentes características, uno mayor y predominantemente hidrofóbico y otro más pequeño y próximo a la superficie que contiene predominantemente grupos hidrofílicos.

Cada monómero de concanavalina A contiene dos sitios de unión diferentes para metales bivalentes y un sitio de unión específico para azúcares tipo D-manosa, D-glucosa y D-fructosa (177, 201). Por lo que respecta a la unión de metales, el sitio S1 une metales de transición tales como Mn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} y más débilmente Zn^{2+} y Cd^{2+} , todos ellos con afinidad por ligandos que contengan nitrógeno, mientras que el sitio S2 une metales bivalentes cuyo radio sea muy próximo a 1 Å, como es el Ca^{2+} (201, 202). La unión de metales de transición, especialmente Mn^{2+} , al sitio S1 es necesaria para que pueda darse la unión de Ca^{2+} al sitio S2 y, a su vez, es necesario que ambos sitios estén ocupados para que se de la unión del carbohidrato (201), de forma que la concanavalina A demetalizada, por exposición a pH ácido, pierde su capacidad de precipitar polisacáridos (203). Los dos sitios de unión de metales se localizan en la parte más ancha de la molécula, alejados de la cavidad central, y situados a 5 Å uno del otro.

Mediante estudios de competición se ha llegado a la conclusión de que el sitio de unión específico para azúcares no se encuentra dentro de la cavidad central, sino que en ésta se encuentra el sitio de unión de diversos iodofenilglicósidos, los cuales se unen probablemente a través de interacciones hidrofóbicas. Recientes estudios de difracción de complejos concanavalina A-azúcar entrecruzados covalentemente han indicado que el sitio de unión específico para azúcares se encuentra en un bolsillo superficial situado a 13 Å del sitio de unión del Mn^{2+} , S1 (204).

I.10.2. Lectina de Lens culinaris

La lectina aislada de *Lens culinaris* presenta, al igual que la concanavalina A, especificidad por D-manosa y D-glucosa, así como por sus α -metil-D-piranosidos (205). Asimismo, es mitogénica y aglutina todos los grupos sanguíneos humanos sin presentar especificidad por ninguno de ellos, aunque sí la muestra para distintas especies (206). Electroforéticamente se distinguen dos variantes de igual peso molecular (52 000) e idénticas propiedades inmunoquímicas y actividad hemaglutinante (207).

Ambas isolectinas están constituidas por dos tipos de cadenas polipeptídicas diferentes; dos cadenas pesadas, H, de 18 000 Da, y dos cadenas ligeras, L, de 8 000 Da, unidas entre sí por enlaces no covalentes (2H + 2L) (208). El análisis de la composición de aminoácidos indica que ambas isolectinas contienen preponderantemente ácido aspártico (o asparagina), treonina, serina y valina (205-207), no contienen metionina (207) y solamente la cadena H contiene cisteína (un resto por cadena) (208). La diferencia en el comportamiento electroforético de ambas isolectinas es atribuible a la mayor concentración de lisina de una de ellas (207).

Las lectinas contienen un 1.5-3% de carbohidrato, principalmente D-glucosa y 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (205). Asimismo, unen Ca^{2+} y Mn^{2+} , los cuales incrementan la actividad hemaglutinante de la lectina, en especial el Mn^{2+} (206). Tanto la demetalización por medio ácido (206) como la disociación de las subunidades (208) conducen a la eliminación del Mn^{2+} sin que se vea afectado el contenido de Ca^{2+} , disminuyendo la actividad hemaglutinante en casi un 95% de manera irreversible, ya que la adición de Mn^{2+} y Ca^{2+} no produce la reactivación de la proteína (206, 208). Por otra parte, las lectinas contienen dos sitios de unión específicos para azúcares por molécula (209).

I.11. OBJETIVOS

Debido a la rápida inactivación de la plasmina en plasma por su inhibidor α_2 -antiplasmina (163) y a la relativamente amplia especificidad de esta enzima (116), es necesario que el proceso de activación del plasminógeno se localice en el trombo para que la fibrinólisis tenga lugar de una manera eficaz y selectiva. El plasminógeno, por lo tanto, ha de unirse a la fibrina y ser activado en su superficie. Sin embargo, la afinidad del plasminógeno nativo por la fibrina es muy pequeña y sólo un 4% del plasminógeno total presente en plasma queda específicamente unido a la fibrina (175). El hecho de que el Lys-plasminógeno muestre mayor afinidad por la fibrina que el Glu-plasminógeno (93, 175) pudiera indicar que esta forma proteolíticamente modificada es fisiológicamente importante en el proceso fibrinolítico. Sin embargo, en la circulación normal la proporción de Lys-plasminógeno es insuficiente para una trombolisis eficaz (210, 211).

El activador tisular del plasminógeno, que es capaz de unirse específicamente a la fibrina (153), forma un complejo ternario con el plasminógeno y la fibrina de forma que tanto la unión del plasminógeno como su activación (212, 155) se ven favorecidas. Sin embargo, ni la uroquinasa ni la estreptoquinasa, los dos agentes trombolíticos más utilizados hasta la fecha, muestran afinidad por la fibrina, por lo que el mecanismo descrito para la fibrinólisis inducida por el activador tisular no parece ser extensivo, o al menos en su totalidad, a la fibrinólisis inducida por estos dos activadores.

La activación del plasminógeno, tanto por uroquinasa (213-215) como por estreptoquinasa (216-218), se ve favorecida en presencia de fibrina y, en menor medida, de fibrinógeno o de sus fragmentos de digestión por plasmina. Ello hace suponer que

la unión del plasminógeno al fibrinógeno o fibrina a través de sus sitios de unión de lisina modifica de alguna manera su conformación facilitando la activación a plasmina.

A pesar de ser objeto de numerosas investigaciones (98, 219-223) no se conoce exactamente la localización de los sitios de unión del plasminógeno en la fibrina. Por otra parte, recientemente se ha sugerido que el ataque inicial de la plasmina a la fibrina tiene como resultado la aparición de nuevos sitios de unión para el plasminógeno (224, 225). De esta forma, los activadores jugarían un papel regulador de la unión del plasminógeno a la fibrina y, en consecuencia, del proceso fibrinolítico.

Por todo ello, hemos abordado el estudio del mecanismo de acción del sistema plasminógeno/plasmina en la fibrinólisis de dos vertientes:

1.- Influencia que la concentración y localización de los activadores, uroquinasa y estreptoquinasa, tienen en la fibrinólisis. El estudio se ha realizado tanto en plasma como en un sistema purificado libre de inhibidores para dos modelos experimentales diferentes: activadores presentes en el momento de formarse la fibrina (los procesos de coagulación y fibrinólisis se disparan simultáneamente) y activadores añadidos "a posteriori" (el proceso fibrinolítico se inicia una vez completada la coagulación).

2.- Identificación de los dominios del fibrinógeno/fibrina implicados en la unión del plasminógeno. Para ello se ha llevado a cabo el bloqueo selectivo de zonas concretas de la molécula de fibrinógeno/fibrina mediante la unión de lectinas a las cadenas de carbohidrato localizadas en los dominios D y E. Se han utilizado las lectinas procedentes de *Canavalia ensiformis* y *Lens culinaris*, cuya especificidad por D-manosa y D-glucosa hace predecible su unión al carbohidrato del fibrinógeno.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. PREPARACION DE PLASMA

Se ha utilizado plasma procedente de donantes normales (3 días después de la extracción) facilitado por los servicios de Hematología de la Ciudad Sanitaria "La Paz" y del Centro Especial "Ramón y Cajal" de Madrid.

Eritrocitos, leucocitos y plaquetas se han eliminado del plasma por centrifugación a 4 300 x g, 10 min. a 10°C, en una centrífuga MSE High Speed 18. Una vez exento de restos celulares el plasma se conservó a -18°C hasta su utilización por tiempo no superior a una semana.

II.2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FIBRINOGENO

II.2.1. Purificación de fibrinógeno

Se ha utilizado fibrinógeno humano (Kabi, Grado L) purificado por el método de Fretto y McKee (226) para la eliminación de plasminógeno contaminante.

200 mg de fibrinógeno, con una coagulabilidad mínima del 90%, se disuelven en 15 ml de tampón 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.2 y se aplican a una columna de Sepharosa-lisina (2.7 x 8.5 cm), eluyendo con el mismo tampón con un flujo de 75 ml/h. Las fracciones que contienen fibrinógeno se reúnen y precipitan mediante la adición, lentamente y con agitación, de 1/3 del volumen total de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M. El fibrinógeno así precipitado se separa por centrifugación a 12 000 x g durante 20 min. y se redisuelve en el tampón adecuado, dializándolo finalmente frente a ese mismo tampón. Todo el proceso se realiza a 4°C.

La columna de Sepharosa-lisina se regenera eluyendo el plasminógeno retenido con ácido ϵ -aminocaproico 0.2 M en 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.2.

El rendimiento del método es de un 80% y el fibrinógeno así purificado presenta una coagulabilidad del 95-98%. La ausencia de plasminógeno contaminante se ha comprobado por incubación de una alícuota de la solución de fibrinógeno con estreptoquinasa (Behring, 5 unidades/mg fibrinógeno) durante 7 h a 37°C y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS para determinar la integridad del fibrinógeno.

II.2.2. Determinación de la concentración de fibrinógeno

La concentración de fibrinógeno se ha determinado espectrofotométricamente por medida de la absorbancia a 280 y 320 nm utilizando el coeficiente de extinción obtenido por Mihalyi (227):

$$E_{280}^{1\%} - E_{320}^{1\%} = 15.06$$

II.2.3. Determinación del porcentaje de proteína coagulable

El grado de pureza del fibrinógeno se ha determinado midiendo la coagulabilidad del mismo con trombina, según el método de Laki (228).

A 1 ml de una solución de fibrinógeno de concentración exactamente conocida (alrededor de 1 mg/ml) en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 se le añaden 20 µl de una solución de trombina bovina (Sigma, 100 NIH/ml en 50 mM citrato sódico, 0.15 M NaCl, pH 6.5). Se agita rápidamente y se deja coagular a temperatura ambiente durante dos horas, al cabo de las cuales se retira el coágulo procurando eliminar la mayor cantidad posible de líquido de su interior. Se determina la concentración de proteína que queda sin coagular en el sobrenadante, a partir de este valor y el de la concentración inicial de fi-

brinógeno se calcula el porcentaje de proteína coagulable.

II.2.4. Determinación de la velocidad de coagulación

Se ha seguido un método basado en el de Belitzer et al. (229).

A 1 ml de una solución de fibrinógeno de concentración 0.5 mg/ml aproximadamente, en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8, se le añaden 5 μ l de trombina (100 NIH/ml), se agita rápidamente y se registra a los 15 s el incremento de absorbancia a 350 nm con el tiempo, en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 2000 con registro gráfico acoplado.

II.3. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE PLASMINOGENO

Se ha utilizado plasminógeno humano Kabi, obtenido por cromatografía de afinidad en Sepharosa-lisina según el método de Deutsch y Mertz (101), de un alto grado de pureza (alrededor de 20 UC/mg de proteína, unidades caseinolíticas conforme a Sgouris et al. (230)). El contenido del vial, aproximadamente 25 UC, liofilizado de una solución en tampón 50 mM fosfato, 41 mM NaCl, 10 mM lisina, 3% glucosa, pH 7.4, se ha disuelto en 2 ml de agua destilada y dializado frente a tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8.

II.3.1. Determinación de la concentración de plasminógeno

La concentración de plasminógeno se ha determinado por medida de la absorbancia a 280 nm, utilizando un valor de

$$E_{280}^{1\%} = 17.0$$

(103).

II.3.2. Determinación de la actividad del complejo plasminógeno-estreptoquinasa

La actividad se ha determinado espectrofotométricamente utilizando el sustrato cromogénico S-2251 (dihidrocloruro de H-D-valil-L-leucil-L-lisil-p-nitroanilida) (Kabi) específico para plasmina y el complejo plasminógeno-estreptoquinasa. El método para la determinación de actividad está basado en la diferencia de absorbancia entre la p-nitroanilida formada enzimáticamente y el sustrato original:



La velocidad de formación de pNA, que puede seguirse por el incremento de absorbancia a 405 nm con el tiempo, es proporcional a la actividad enzimática (231).

10 μ l de la solución de plasminógeno se diluyen hasta 250 μ l con agua destilada ajustando el pH a 3-4 con HCl y se incuban 10 min a 37°C con 75 μ l de estreptoquinasa 10 000 IU/ml en agua destilada (Sigma, 100 000 unidades/mg estreptoquinasa). Inmediatamente después se le añaden 0.48 ml de 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 y 200 μ l de sustrato 3 mM en agua destilada, se agita rápidamente y se registra a los 10 s el incremento de absorbancia a 405 nm con el tiempo. A partir de la velocidad inicial puede calcularse la actividad, teniendo en cuenta que para 0.0078 UC/ml (concentración final) se produce un incremento de absorbancia de 0.05 por minuto.

En estas condiciones (exceso de estreptoquinasa con respecto al plasminógeno) todo el plasminógeno se encuentra formando complejo con la estreptoquinasa por lo que se está midiendo realmente la actividad del complejo.

II.3.3. Obtención de Lys-plasminógeno a partir de Glu-plasminógeno

Se ha utilizado el método descrito por Castellino y Powell (232).

Una solución de Glu-plasminógeno en tampón 50 mM Tris-HCl, 0.1 M lisina, pH 8.0 se incuba con plasmina libre de activadores (Kabi, 20 UC/mg plasmina) disuelta en el mismo tampón, en proporción de 8 µg de plasmina por miligramo de plasminógeno, a 30°C durante 2 h. El paso de Glu-plasminógeno a Lys-plasminógeno puede seguirse por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Para eliminar posteriormente la plasmina se añade a la mezcla de incubación un exceso de inhibidor de tripsina procedente de soja (Sigma) inmovilizado en Sepharosa y se agita la solución a 20°C durante dos horas más. Transcurrido este tiempo se separa la Sepharosa por centrifugación y el Lys-plasminógeno libre de plasmina se dializa frente a tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8.

II.3.4. Caracterización del plasminógeno por análisis del grupo aminoterminal con cloruro de dansilo

Se ha utilizado el método simplificado descrito por Gray y Hartley (233).

De 20-30 µg de proteína disueltos en agua destilada se liofilizan y redisuelven en 30 µl de 0.2 M NaHCO₃ pH 8.5. Se añaden 30 µl de cloruro de dansilo 2.5 mg/ml en acetona y la mezcla se incuba a 30-40°C durante 2 h. La hidrólisis de la proteína dansilada se lleva a cabo añadiendo 60 µl de HCl Concentrado (concentración final 6N) e incubando a 108°C durante 16 h. El hidrolizado se liofiliza y se redisuelve en 100-200 µl de 1 M acetona-HCl 19:1.

La identificación de los dansil-aminoácidos se ha realizado por cromatografía en capa fina utilizando como disolvente

hidróxido amónico al 1%. Como patrones se han utilizado cloruro de dansilo, ácido dansil-glutámico, di-dansil-lisina, dansil-lisina y dansil-tirosina (Mann Research Laboratories). La cromatografía se ha realizado en placas de poliamida (Cheng Chin Trading Co) y los aminoácidos dansilados se han localizado iluminando con luz ultravioleta para lo cual se ha empleado una lámpara Desaga UVIS.

II.4. ESTUDIOS DE FIBRINOLISIS EN PLASMA Y SISTEMA PURIFICADO

II.4.1. Preparación de coágulos de plasma

Los coágulos de plasma se han preparado añadiendo a 1 ml de plasma CaCl_2 en concentración final 0.025 M y dejando coagular a 20°C durante 2 h. Pasado este tiempo los coágulos se despegan suavemente de las paredes del tubo.

En algunos casos los coágulos han sido separados de la fase líquida por centrifugación a 4 000 x g durante 20 min. A continuación se secan sobre papel absorbente y se lavan sumergiéndolos en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (5 lavados de 5 ml cada uno).

II.4.2. Preparación de coágulos de fibrina (sistema purificado)

Los coágulos de fibrina se han obtenido tras incubación durante 2 h a 20°C de fibrinógeno (1 mg/ml), plasminógeno (45 µg/ml) (a menos que se indique específicamente se trata de la forma Glu), CaCl_2 (25 mM), cisteína (12.5 mM) y trombina (2 NIH/ml), en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (volumen total de 1 ml). El factor XIII se encuentra presente como contaminante del fibrinógeno en cantidad suficiente para asegurar el

tramado de la fibrina.

Una vez formados los coágulos se despegan de las paredes del tubo y en algunos casos se retraen por centrifugación y se lavan como ya se ha indicado para coágulos de plasma (II.4.1.).

II.4.3. Fibrinólisis exógena

La fibrinólisis exógena se ha inducido por adición de estreptoquinasa (Behring, 400 UI/mg estreptoquinasa) o uroquinasa (Merrell Dow, 150 000 UI/mg uroquinasa) en la concentración deseada (disoluciones recién preparadas) a los coágulos intactos y a los coágulos retraídos resuspendidos en 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (volumen total de 1 ml).

En el primer caso la fibrinólisis se ha seguido por determinación del porcentaje de fibrina en el coágulo a distintos tiempos, tomando como 100% la cantidad de fibrina presente en el coágulo a tiempo cero. Para ello los coágulos se retraen y se lavan, tal como se ha indicado para coágulos no activados (II.4.1.) y finalmente se disuelven en un volumen conocido de 1 M NaOH. La concentración de fibrina se calcula utilizando un coeficiente de extinción

$$E_{280}^{1\%} - E_{320}^{1\%} = 13.5$$

calculado previamente con distintas concentraciones de fibrinógeno en 1 M NaOH.

La fibrinólisis exógena inducida en coágulos retraídos y lavados se ha seguido por medida de la aparición de absorbancia en el sobrenadante a 280 y 320 nm con el tiempo. El porcentaje de material lisado se ha calculado tomando como 100% el valor de concentración obtenido al provocar la lisis total del coágulo con 1 M NaOH.

II.4.4. Fibrinólisis endógena

La fibrinólisis endógena se ha inducido disparando simultáneamente los procesos de coagulación y fibrinólisis. Para ello los coágulos se forman tal y como está descrito en los apartados II.4.1. y II.4.2. para plasma y sistema purificado, respectivamente, pero en presencia, además, del activador en la concentración deseada. La eficacia fibrinolítica se ha determinado midiendo la variación en el porcentaje de fibrina en los coágulos con el tiempo, según se ha descrito anteriormente (II.4.3.), así como el tiempo total de lisis de los mismos.

II.5. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE LOS FRAGMENTOS D Y E DE DIGESTION DEL FIBRINOGENO POR PLASMINA

Los fragmentos D y E se han obtenido por digestión del fibrinógeno por plasmina y fraccionamiento del digerido por cromatografía en Sepharosa-lisina, según el método de Rupp et al. (234).

II.5.1. Digestión del fibrinógeno por plasmina

25 mg de fibrinógeno en tampón 50 mM trietanolamina (TEA) -HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4 (10 mg/ml) se digieren durante 3 h a 37 °C con plasminógeno (1 UC/ml) activado por estreptoquinasa (20 UI/ml). El grado de digestión del fibrinógeno se comprueba por electroforesis en gel de poli-acrilamida en presencia de SDS.

II.5.2. Fraccionamiento del digerido por cromatografía de intercambio iónico en Sepharosa-lisina

El digerido se dializa frente a tampón 10 mM TEA-HCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4 y se aplica a una columna de

Sepharosa-lisina (1.9 x 15 cm) equilibrada con este mismo tampón. La elución se realiza a un flujo de 60 ml/h y se recogen fracciones de 200 gotas en las que se mide absorbancia a 280 nm para detectar la presencia de proteína.

En el volumen de vacío se eluyen péptidos de peso molecular menor de 10 000 Da y carentes de carbohidrato, mientras que los fragmentos D y E quedan retenidos en la columna y pueden ser eluidos sucesivamente mediante tampones de creciente fuerza iónica:

1Q - 30 mM TEA-HCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4

2Q - 50 mM TEA-HCl, 0.02 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4

3Q - 50 mM TEA-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.4

Con el primer tampón se eluye fundamentalmente fragmento D₁, con el segundo una mezcla de fragmentos D (D₁, D₂, D₃ y D₁-D₁) y con el tercero se eluye mayoritariamente fragmento E, según se comprueba por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de muestras de las diferentes fracciones.

La plasmina, retenida por su afinidad a la lisina, se eluye con tampón 50 mM TEA-HCl, 0.2 M ácido ε-aminocaproico, 4 M urea, 0.02% NaN₃, pH 7.4. Finalmente, la columna se regenera con cloruro de guanidina 5 M.

Las fracciones que contienen los distintos fragmentos se reúnen y se concentran por ultrafiltración en un concentrador Amicon sobre membranas PM 10. Por último, los distintos fragmentos se dializan frente a tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8.

II.5.3. Determinación de la concentración de los fragmentos D y E

La concentración de cada fragmento se ha determinado por

medida de la absorbancia a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción dados por Marder et al. (24):

$$E_{280}^{1\%} = 20.8 \text{ para el fragmento D}$$

$$E_{280}^{1\%} = 10.2 \text{ para el fragmento E}$$

II.6. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LECTINAS

II.6.1. Concanavalina A y acetil-concanavalina A

Se ha utilizado concanavalina A (Con A) (Sigma) en disoluciones de aproximadamente 10 mg/ml en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8, preparadas poco tiempo antes de ser utilizadas.

II.6.1.1. Preparación de acetil-concanavalina A

La acetil-concanavalina A (Ac-Con A) se ha preparado por el método de Gunther et al. (195).

Se disuelven 25 mg de Con A en 7 ml de acetato sódico saturado y se le añaden 40 μ l de anhídrido acético, incubándose la mezcla con agitación durante 1 h en un baño de hielo. Transcurrido este tiempo, la solución se dializa repetidas veces frente a agua destilada y finalmente se liofiliza.

El grado de asociación a pH neutro del derivado acetilado se comprueba por ultracentrifugación analítica utilizando como control Con A.

II.6.1.2. Determinación de la concentración de Con A y Ac-Con A

La concentración de Con A y Ac-Con A se ha determinado espectrofotométricamente por medida de la absorbancia a 280 nm utilizando en ambos casos el coeficiente de extinción dado por Wang y Edelman (235):

$$E_{280}^{1\%} = 13.7$$

II.6.2. Lectina de Lens culinaris

II.6.2.1. Purificación de la lectina de Lens culinaris

Se ha seguido el método modificado de Howard et al. (207).

50 g de semillas de *Lens culinaris* se suspenden en 250 ml de tampón 10 mM fosfato, 0.15 M NaCl, pH 7.4, durante 16 h a 4°C. Transcurrido este tiempo la suspensión se tritura en un homogeneizador Sorvall Omni Mixer y se deja a 4°C durante 15-30 min más, centrifugándose después 20 min a 12 000 x g. Al sobrenadante se le añade $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 30% de saturación, el precipitado se elimina por centrifugación y al sobrenadante se le añade de nuevo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 80% de saturación, lentamente y con agitación, durante dos horas a 4°C. El precipitado se resuspende en el mínimo volumen posible de 5 mM Tris-HCl, 5 mM MnCl_2 , pH 7.6 y se dializa exhaustivamente frente a este mismo tampón. Una vez dializada, la solución se centrifuga de nuevo para eliminar el precipitado aparecido durante la diálisis y se aplica a una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia) (1.8 x 55 cm) previamente equilibrada con el mismo tampón utilizado en la diálisis. Se lava con este tampón hasta que la absorbancia a 280 nm sea menor de 0.05 y la lectina retenida se eluye con tampón 5 mM Tris-HCl, 5 mM MnCl_2 , 0.1 M α -MDGP, pH 7.6. Las fracciones que contienen proteína, según se detecta por medida de absorbancia a 280 nm, se reúnen y se dializan frente a agua destilada, liofilizando finalmente la solución.

II.6.2.2. Determinación de la concentración de LcH

La concentración de la lectina de *Lens culinaris* (LcH) se ha determinado por medida de la absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción dado por Howard et al. (207):

$$E_{280}^{1\%} = 12.6$$

II.6.2.3. Determinación de la actividad hemaglutinante de LcH

Los eritrocitos se han obtenido de sangre de rata. 1 ml de sangre se recoge en 6 ml de tampón 5 mM fosfato, 0.15 M NaCl, 10 mM citrato sódico, pH 7.6. La suspensión se centrifuga a 6 000 x g durante 1 min y los eritrocitos se lavan dos veces con el mismo tampón y otras dos veces con este tampón sin citrato. Finalmente se resuspenden en una proporción 1:10 del tampón sin citrato.

El título de hemaglutinación se ha determinado incubando 50 μ l de diluciones sucesivas de la lectina con 50 μ l de la suspensión de eritrocitos; la menor concentración de lectina que aglutina los eritrocitos después de 1 h de incubación a 20°C, en nuestro caso 0.03 \pm 0.01 mg/ml, es el título de hemaglutinación.

II.6.3. Marcaje de lectinas con ^{125}I

El marcaje de las lectinas con ^{125}I se ha llevado a cabo por el método de la lactoperoxidasa (236).

En un tubo de ensayo que contenga 2 ó 3 bolitas de vidrio para facilitar la mezcla de los reactivos se añaden por este orden y en vitrina:

- 1 mg de lectina en 100 μ l de tampón 0.1 M acetato, pH 5.0
- 2-4 μ l de ^{125}I en solución de NaOH que contiene 100 mCi/ml (Amersham)
- 5 μ l de una solución de lactoperoxidasa (Sigma, 80 unidades/mg proteína) en tampón acetato 0.1 M, pH 5.0, de concentración 0.2 mg/ml
- 5 μ l de H_2O_2 0.03 g/l recién abierta (25 μ l de H_2O_2 de 110 volúmenes (Foret) en 2.75 ml de agua destilada)

Se tapa el tubo y se deja 15 min a 20°C con agitación ocasional.

Se añaden de nuevo 5 μ l de lactoperoxidasa y 5 μ l de H_2O_2 y se deja otros 15 min. Al final de la reacción la mezcla se aplica a una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia) (0.7 x 30 cm) previamente equilibrada con tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8. Se recogen fracciones de aproximadamente 0.5 ml y se mide radiactividad, utilizando un Radioimmuno Analyzer Beckman Iodine-125, en 10 μ l de muestra. El primer pico que se obtiene contiene ^{125}I -lectina y el segundo pico ^{125}I libre. Se agrupan las fracciones correspondientes a la lectina marcada y se dializan frente a tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 a 40C para eliminar el ^{125}I libre que pudieran contener.

II.7. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS LECTINA-FIBRINOGENO/MONOMERO DE FIBRINA/FRAGMENTOS D Y E

II.7.1. Preparación de complejos lectina-fibrinógeno/fragmentos D y E

Los complejos se han preparado incubando soluciones de fibrinógeno, fragmento D_1 o fragmento E con diferentes concentraciones de lectina durante 30 min a 200C, en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.8. En este tiempo de incubación se alcanza totalmente el equilibrio de unión (237).

II.7.2. Preparación de complejos lectina-monómero de fibrina.

II.7.2.1. Obtención de monómeros de fibrina

Los monómeros de fibrina se han obtenido incubando una solución de fibrinógeno (1 mg/ml) en tampón 20 mM acetato, 0.1 M NaCl, pH 5.2 con trombina (2 NIH/mg fibrinógeno) durante 2 h a 200C. En estas condiciones no se observa agregación de monó-

meros por ultracentrifugación analítica.

La liberación de los fibrinopéptidos se ha seguido por el método de Gralnick et al. (238), midiendo arginina soluble.

A 1 ml de la solución de fibrina anterior se le añaden 25 μ l de ácido tricloroacético al 100% y se incuba 15 min a 20°C. Después de centrifugar se toma una alícuota de 0.45 ml del sobrenadante a la que se añaden 0.45 ml de KOH al 10%, 0.1 ml de 8-hidroxiquinoleína al 0.1% en etanol y 0.1 ml de N-bromosuccinimida al 0.5% recién preparada y fría. A los 15 s exactos se añaden 50 μ l de urea al 40% y se lee inmediatamente la absorbancia a 520 nm. Como patrón se utiliza arginina.

II.7.2.2. Formación de los complejos

Los complejos se han preparado incubando soluciones de fibrina, de concentración 1 mg/ml, con diferentes concentraciones de lectina durante 30 min a 20°C en tampón 20 mM acetato, 0.1 M NaCl, pH 5.2.

II.7.3. Unión de ¹²⁵I-Ac-Con A al fibrinógeno

Los estudios de unión de ¹²⁵I-Ac-Con A al fibrinógeno se han realizado incubando una solución de fibrinógeno (2.5 μ M) con diferentes cantidades de una mezcla de lectina fría y marcada (de 2 a 28 μ M) en un volumen total de 1 ml de tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8, durante 30 min a 20°C. De esta mezcla de incubación se toman muestras de 200 μ l en las que se mide radiactividad total. Pasado el tiempo de incubación se separa la lectina unida de la libre por coagulación del fibrinógeno y sus complejos con 20 μ l de trombina. Transcurridas 2 h los coágulos se separan por centrifugación (4 000 x g, 20 min) y se toman muestras de 200 μ l del sobrenadante en las que se mide radiactividad.

La concentración de lectina unida se calcula por diferencia entre la concentración total y la lectina presente en el sobrenadante. El porcentaje de lectina atrapada en la red de fibrina o unida inespecíficamente se determina en experimentos paralelos realizados en presencia de 0.1 M α -MDGP. El número de sitios de unión y la constante de disociación se calculan a partir de la representación de Scatchard de los datos obtenidos (239).

II.7.4. Unión de 125 I-lectinas a Sepharosa-fibrinógeno

La unión de 125 I-lectinas al fibrinógeno inmovilizado se ha estudiado incubando una suspensión de Sepharosa-fibrinógeno en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (concentración final de fibrinógeno 1.6 μ M) con diferentes cantidades (concentración final de lectina de 0.8 a 6.4 μ M) de una mezcla de lectina fría y marcada de la que se mide radiactividad en 5 μ l de muestra. Después de 30 min de incubación a 20°C, la Sepharosa-fibrinógeno se separa por centrifugación y del sobrenadante se toma una muestra de 200 μ l en la que se mide radiactividad.

La concentración de lectina unida se calcula por diferencia entre la concentración total y la lectina presente en el sobrenadante. Para determinar el porcentaje de lectina unida inespecíficamente a la Sepharosa se han realizado experimentos paralelos en presencia de 0.1 M α -MDGP.

Se ha estudiado también la unión de 125 I-Con A dímero al fibrinógeno inmovilizado, para lo cual se ha incubado la suspensión de fibrinógeno (1.5 μ M) con cantidades diferentes de la mezcla Con A fría- 125 I-Con A (1.1-11.3 μ M) en tampón 20 mM acetato sódico, 0.1 M NaCl, pH 5.2. Los experimentos se han realizado siguiendo el mismo procedimiento que a pH neutro.

do la concentración final de los fragmentos en la mezcla de reacción 4 μ M. Asimismo, el carácter específico de la unión se determina realizando los mismos experimentos en presencia de 0.1 M α -MDGP.

Las diferentes muestras se han separado e identificado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y posterior autorradiografía de los geles.

II.7.6. Cromatografía de afinidad en Sepharosa-lectina

Se ha estudiado la unión del fibrinógeno y sus fragmentos D y E a las lectinas inmovilizadas en Sepharosa, en tampón 10 mM Tris-HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.8 ó 20 mM acetato sódico, 1.0 M NaCl, pH 5.2, a 20°C. Las muestras (entre 1.3 y 2 mg de proteína) se han aplicado a una columna de 4.5-5 ml de Sepharosa-lectina con una concentración de lectina de 2.5 mg/ml de gel y la proteína retenida se ha eluido con 0.5 M α -MDGP en el tampón correspondiente.

II.7.7. Determinación de coeficientes de sedimentación

La determinación de los coeficientes de sedimentación se ha realizado en una ultracentrífuga Beckman, modelo E, con sistema óptico de Schlieren. Se ha utilizado un rotor de titanio ANH y células de ultracentrifugación de aluminio de doble sector y 12 mm de paso óptico. Los experimentos se han realizado a 60 000 rpm y 20°C. Las placas se han medido en un microcompañador Nikon modelo 6C. Las medidas se corrigen a distancias reales al eje de giro y se calculan los coeficientes de sedimentación según la ecuación:

$$s = \frac{2.303 (\log r_2 - \log r_1)}{60 \omega^2 (t_2 - t_1)}$$

La velocidad de sedimentación de las lectinas, el fibrinógeno, sus fragmentos D y E y los correspondientes complejos se ha estudiado en tampón 10 mM Tris-HCl 0.15 M NaCl pH 7.8, para concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml de cada proteína.

II.8. ESTUDIOS DE LISIS POR PLASMINA DE FIBRINOGENO, MONOMEROS DE FIBRINA Y SUS COMPLEJOS CON LECTINAS

La lisis por plasmina del fibrinógeno y sus complejos con lectinas se ha estudiado incubando 1 ml de la solución de fibrinógeno/complejos lectina-fibrinógeno (concentración final de fibrinógeno de 3 mg/ml) en 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8, con 30 μ l de Glu-plasminógeno (0.5 mg/ml) y 30 μ l de estreptoquinasa (160 UI/ml) a 20°C. A diferentes tiempos se separan alícuotas de la mezcla de incubación para su análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, bien tras su reducción con β -mercaptoetanol (3% concentración final, 3 min 100°C) o bien sin reducción previa.

Del mismo modo, la digestión de monómeros de fibrina se ha seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de muestras, reducidas o sin reducir, tomadas a distintos tiempos de una mezcla de incubación constituida por 1 ml de solución de monómeros de fibrina/complejos lectina-monómero de fibrina en tampón 20 mM acetato sódico, 0.1 M NaCl, pH 5.2, 75 μ l de Glu-plasminógeno (0.5 mg/ml) y 75 μ l de estreptoquinasa (160 UI/ml), con una concentración final de monómeros de fibrina de 1 mg/ml.

II.9. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE COMPLEJOS LECTINA-FIBRINA

II.9.1. Obtención de complejos lectina-fibrina

Los complejos lectina-fibrina se han preparado por adición de trombina (2 NIH/mg fibrinógeno) a una solución del complejo lectina-fibrinógeno (concentración final de fibrinógeno 1 mg/ml) en presencia de plasminógeno (45 μ g/ml ó 15 μ g/ml), CaCl_2 (25 mM) y cisteína (12.5 mM), en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (volumen final 1 ml). Después de 2 h de incubación a 20°C, los coágulos así formados se despegan de las paredes del tubo suavemente y en algunos casos se retraen por centrifugación y se lavan como ya se ha descrito en el apartado II.4.1.

II.9.2. Determinación de la velocidad de coagulación de los complejos lectina-fibrinógeno

La velocidad de coagulación de los complejos lectina-fibrinógeno se ha determinado tal y como se ha descrito en el apartado II.2.4., siguiendo la aparición de absorbancia a 350 nm con el tiempo tras la adición de trombina.

II.9.3. Determinación del porcentaje de proteína coagulable

La coagulabilidad del fibrinógeno en los complejos lectina-fibrinógeno se ha determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS ya que la presencia de la lectina impide utilizar el método de Laki, descrito en el apartado II.2.3.

A 1 ml de una solución del complejo lectina-fibrinógeno, en el que la concentración de fibrinógeno sea alrededor de 1 mg/ml, se le añaden, después de haber tomado una muestra para electroforesis, 20 μ l de trombina (100 NIH/ml) y se incuba a

20°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo se retira el coágulo y se toma del sobrenadante otra muestra para electroforesis. La cantidad de fibrinógeno en ambas muestras se determina por densitometrado de los geles y medida del área de los picos y el porcentaje de fibrinógeno coagulable se determina a partir de la cantidad de fibrinógeno total y de fibrinógeno en el sobrenadante.

II.9.4. Determinación del grado de entrecruzamiento de la fibrina en los complejos lectina-fibrina

El grado de entrecruzamiento de la fibrina puede determinarse fácilmente observando la proporción de cadena α y de cadena γ que permanecen como cadenas sencillas sin entrecruzarse. Para ello, los complejos lectina-fibrina se reducen totalmente con β -mercaptoetanol (concentración final 3%) a 100°C y el material reducido se analiza por electroforesis en gel de poli-acrilamida en presencia de SDS. La cantidad de cadena α y γ se determina por densitometrado de los geles y medida del área de los picos, tomando en todos los casos la cadena β como estándar. Como control para determinar el 100% de cadena α y γ sin entrecruzarse se utiliza fibrinógeno.

II.9.5. Elución de lectinas de los complejos lectina-fibrina

Las lectinas unidas a la fibrina pueden ser eluidas de la misma por el azúcar específico, α -MDGP. Para ello, los coágulos retraídos y lavados se resuspenden (30 min a 20°C) en sucesivos volúmenes (150 μ l) de tampón 10 mM Tris-HCl, 0.2 M α -MDGP, 0.15 M NaCl, pH 7.8. La cantidad de lectina eluida se determina por electrop

foresis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las distintas eluciones.

II.10. ESTUDIOS DE FIBRINOLISIS DE COMPLEJOS LECTINA-FIBRINA

II.10.1. Fibrinólisis exógena

La fibrinólisis exógena se ha inducido por adición de estreptoquinasa (19 UI/ml) a los complejos lectina-fibrina, intactos o retraídos y resuspendidos en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8, volumen total de 1 ml.

En el primer caso, la digestión se ha seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de los complejos totalmente reducidos a diferentes tiempos de incubación.

La fibrinólisis inducida en complejos lectina-fibrina previamente retraídos y lavados se ha seguido por medida de la aparición de absorbancia en el sobrenadante a 280 nm y 320 nm con el tiempo, según se ha descrito en el apartado II.4.3. y por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de muestras reducidas a distintos tiempos de lisis.

II.10.2. Fibrinólisis endógena

La fibrinólisis endógena se ha inducido preparando los complejos lectina-fibrina, tal como se ha descrito en el apartado II.9.1., en presencia de estreptoquinasa (19 UI/ml). La digestión se ha seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de coágulos totalmente reducidos a diferentes tiempos de incubación.

II.11. DETERMINACION DE PLASMINOGENO UNIDO A FIBRINA

II.11.1. Marcaje de plasminógeno con ^{125}I

El plasminógeno se ha marcado utilizando glucosa oxidasa y lactoperoxidasa inmovilizadas (Bio-Rad), según el método de Suenson y Thorsen (242). Este método proporciona las condiciones más suaves posibles para el marcaje de proteínas con ^{125}I . Tras la adición de β -D-glucosa, la glucosa oxidasa inmovilizada genera continuamente una pequeña cantidad de H_2O_2 . A su vez la lactoperoxidasa cataliza la peroxidación del Na^{125}I a ^{125}I libre, el cual reacciona con la proteína.

En un tubo de ensayo que contenga 2 ó 3 bolitas de vidrio para facilitar la mezcla de los reactivos se añaden por este orden y en vitrina:

- 150 μl de Glu-plasminógeno de concentración 1 mg/ml en tampón 0.2 M fosfato sódico, pH 7.2
- 50 μl del reactivo reconstituido con agua destilada (0.5 ml por vial de 10 reacciones) al menos 1 h antes de ser utilizado
- 3 μl de ^{125}I en solución de NaOH que contiene 100 mCi /ml (Amersham)
- 50 μl de D-glucosa al 2% (o 50 μl de β -D-glucosa al 1%)

Se mezclan los reactivos y se deja incubando 15 min a 20°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se aplica directamente a una columna de Sephadex G-25 (0.7 x 30 cm) previamente equilibrada con tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.8. Se recogen fracciones de aproximadamente 0.5 ml y se mide radiactividad en 10 μl de cada fracción. El primer pico que se obtiene contiene el ^{125}I -plasminógeno y el segundo pico ^{125}I libre. Se agrupan las fracciones correspondientes al plasminógeno marcado y se dializan frente al mismo tampón de elución, a 4°C,

para eliminar el ^{125}I libre contaminante. Una vez dializado se comprueba la integridad del ^{125}I -plasminógeno por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y posterior autoradiografía de los geles, comparando su movilidad electroforética con la del plasminógeno sin marcar.

II.11.2. Unión de ^{125}I -plasminógeno a fibrina y a los complejos lectina-fibrina

Los estudios de unión se han realizado incubando una solución de fibrinógeno o del complejo lectina-fibrinógeno (concentración final de fibrinógeno 1 mg/ml) con trazas de ^{125}I -plasminógeno en presencia de plasminógeno frío (45 $\mu\text{g/ml}$ de concentración total de plasminógeno), CaCl_2 (25 mM) y cisteína (12.5 mM), en tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 (volumen total 1 ml). De esta mezcla de incubación se mide radiactividad en 200 μl y el resto se coagula por adición de trombina (2 NIH/mg fibrinógeno). Transcurridas 2 h se separa el coágulo de las paredes del tubo y se retrae por centrifugación (4 000 x g durante 20 min). Del sobrenadante se toma una muestra de 200 μl en la que se mide radiactividad. Por otra parte, los coágulos se lavan sumergiéndolos 5 veces en tampón (5 ml) y finalmente se disuelven en 1 ml de tampón 10 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, 2% SDS, pH 7.0 que contiene además β -mercaptoetanol al 3%, calentando a 100°C durante 3 min. Se mide radiactividad en 750 μl de estas muestras y otros 50 μl se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS y posterior autoradiografía.

De esta manera se determina, por una parte, el plasminógeno unido inicialmente a la fibrina, por diferencia entre la concentración total y el plasminógeno presente en el sobrena-

dante, y, por otra, el plasminógeno que permanece unido en el coágulo retraído y lavado. El porcentaje de plasminógeno atrapado en la red de fibrina o unido inespecíficamente se determina en experimentos paralelos realizados en presencia de 0.2 M lisina.

II.11.3. Elución de plasminógeno unido a la fibrina

La cantidad de plasminógeno que permanece unido al coágulo se ha estudiado también utilizando zimógeno frío. El plasminógeno unido a la fibrina puede ser eluido de la misma por ácido ϵ -aminocaproico. Para ello, los coágulos retraídos y lavados se sumergen en sucesivos volúmenes (150 μ l) de tampón 10 mM Tris-HCl, 0.1 M ϵ -ACA, 0.15 M NaCl, pH 7.8, dos veces durante 30 min y una tercera vez durante 16 h, a 20°C, juntando finalmente 100 μ l de cada extracción. La cantidad de plasminógeno en la mezcla se ha determinado por medida de la actividad, utilizando el sustrato cromogénico S-2251 (II.3.2.) y por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de alícuotas de la mezcla de eluatos.

II.12. DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE LAS LECTINAS EN LA FORMACION Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO PLASMINOGENO-ESTREPTOQUINASA

Se ha estudiado la posible influencia de las lectinas en la formación y actividad del complejo plasminógeno-estreptoquinasa en las mismas condiciones en las que se han realizado los estudios de fibrinólisis, utilizando el sustrato cromogénico S-2251.

El efecto de las lectinas en la actividad del complejo se ha determinado incubando con estreptoquinasa (19 UI) el

plasminógeno (15 µg), ya sea solo o incubado previamente con las lectinas en la proporción deseada (30 min a 20°C). Después de 10 min a 37°C se añaden 200 µl de sustrato S-2251 3 mM en agua destilada y tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 hasta 1 ml de volumen final, se agita rápidamente y se registra a los 10 s el incremento de absorbancia a 405 nm con el tiempo.

Para determinar la influencia de las lectinas en la formación del complejo plasminógeno-estreptoquinasa se añaden simultáneamente la estreptoquinasa (concentración final 19 UI/ml) y el sustrato al plasminógeno (concentración final 15 µg/ml), ya sea solo o previamente incubado con las lectinas, en un volumen total de 1 ml de tampón 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8. Se agita rápidamente y se registra la variación con el tiempo de la absorbancia a 405 nm.

II.13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

Las electroforesis se han realizado según el método de Laemli (243) en geles con una concentración de acrilamida de un 7.5 a un 12%, preparados con las siguientes soluciones:

	7.5%	12%
Agua destilada	14.85 ml	9.6 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	7.5 ml	7.5 ml
Acrilamida 30% /		
Bis-acrilamida 0.6%	7.5 ml	12.0 ml
SDS 10%	0.3 ml	0.3 ml
TEMED	15 µl	15 µl
Persulfato amónico 10%	100 l	100 l

En el gel de apilamiento se ha utilizado un 4.5 %

de acrilamida y la siguiente composición:

Agua destilada	6.3 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Acrilamida 30% /	
Bis-acrilamida 0.6%	1.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
TEMED	5 μ l
Persulfato amónico 10%	100 μ l

Las muestras se aplican diluidas al menos en el mismo volumen de tampón 10 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, 2% SDS, pH 7.0, después de añadirles 10 μ l de azul de bromofenol al 3% en glicerol al 50% como indicador.

Cuando es necesario las muestras se reducen con β -mercaptoetanol al 3%, calentando a 100°C durante 3 min.

Las electroforesis se han realizado en un Protean 16 de Bio-Rad, utilizando como tampón de electroforesis 0.025 M Tris-0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3 y a una temperatura constante de 20°C, mantenida mediante un circuito de refrigeración.

La duración de la electroforesis depende de la diferencia de potencial utilizada; en nuestro caso se han realizado generalmente a 50 V (18 h) ó 200 V (3 h).

Las bandas de proteína se han localizado por tinción con azul de Coomassie (Fluka, R250) al 0.25% en metanol al 45% y ácido acético al 5% durante 1 h. A continuación los geles se destiñen por difusión en una solución de metanol-ácido acético-agua (9:1:10 en volumen) (244).

La tinción de glicoproteínas se ha llevado a cabo por el método de Zacharius et al. (245). Se introducen los geles en una solución al 12% de ácido tricloroacético durante 30 min.

Transcurrido este tiempo se lavan ligeramente con agua destilada y se sumergen en una solución de ácido periódico al 1% en ácido acético al 3%, durante 50 min. Posteriormente se lavan exhaustivamente con agua destilada (tres cambios en 12 h) y se introducen en una solución de sulfito de Fuschina (reactivo de Schiff) durante 50 min en la oscuridad. Después los geles se lavan con metabisulfito sódico al 0.5% recién preparado, tres veces durante 10 min cada vez, y finalmente se destiñen de la misma forma que para la tinción con azul de Coomassie.

Los geles desteñidos se secan entre hojas de celofán y se densitometran en un aparato Joyce Loebel modelo MKIIC. La movilidad electroforética de cada una de las bandas se calcula dividiendo la distancia que ha migrado la proteína por la distancia que ha migrado el azul de bromofenol y los pesos moleculares correspondientes se determinan según el método de Weber y Osborn (246), teniendo en cuenta que la movilidad electroforética es inversamente proporcional al logaritmo decimal del peso molecular.

Las bandas de material radiactivo se han localizado por autorradiografía de los geles. Para ello el gel seco se pone directamente en contacto con una placa autorradiográfica médica MAFE RP-X7 y ambos se colocan en un chasis con pantalla amplificadora Dupont, de 1 a 3 días, a -70°C. Después la placa se revela normalmente y el peso molecular de las bandas se determina como ya se ha descrito para las bandas de proteína.

II.14. ACTIVACION DE SEPHAROSA E INMOVILIZACION DE LIGANDOS

II.14.1. Activación de Sepharosa con CNBr

Se ha utilizado CNBr-Sepharosa 4B comercial (Pharmacia)

o Sepharosa activada por el método de Cuatrecasas (247).

100 ml de Sepharosa 4B sedimentada (Pharmacia) se suspenden en 100 ml de agua destilada y se le añade con agitación y en vitrina, 4 g de CNBr disueltos en el mínimo volumen posible de acetonitrilo. Durante 10 min se mantiene el pH de la suspensión alrededor de 11 mediante la adición, con agitación continua y suave, de NaOH 8 N. Transcurrido este tiempo la mezcla se enfría rápidamente con hielo y se filtra en un embudo Buchner colocando en el quitasato CuSO_4 y NaOH sólidos para provocar la descomposición del CNBr que no haya reaccionado. Finalmente se lava con 2 l de 0.1 M NaHCO_3 , pH 8.0 frío.

La Sepharosa activada es muy inestable por lo que las operaciones de lavado y adición del ligando deben hacerse rápidamente.

II.14.2. Unión de lisina a la Sepharosa activada

A 14 g de Sepharosa activada se le añaden 10 g de L-lisina disueltos en 25 ml de 0.1 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl, pH 8.4 y se incuban a 40°C durante 24 h con agitación rotatoria suave. Transcurrido este tiempo la Sepharosa se filtra y se lava con tres ciclos de 0.1 M acetato sódico, 1 M NaCl, pH 4.0 y 0.1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 8.0 (1 litro en total de cada tampón) y finalmente con agua destilada.

II.14.3. Unión del inhibidor de tripsina a la Sepharosa activada

Se prepara una disolución del inhibidor de tripsina procedente de soja (STI) en 0.1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 8.0 y se determina su concentración exacta por medida de la absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción dado por

Rackis et al. (248):

$$E_{280}^{1\%} = 9.94$$

4 ml de una solución de STI, 2.5 mg/ml, se incuban con 1 g de Sepharosa activada, con agitación rotatoria suave a 40C durante 16 h. Transcurrido este tiempo se le añade a la mezcla de incubación 0.14 ml de etanolamina 100 mM, pH 8.4, para neutralizar los grupos reactivos que pudieran quedar sin reaccionar, y se incuba durante 1 h más con agitación. Una vez completada la incubación, la suspensión se filtra y se mide la absorbancia del filtrado y de los subsiguientes lavados con 0.1 M NaHCO₃, 1 M NaCl, pH 8.0, para determinar el rendimiento de la unión. En nuestro caso éste ha sido del 95.4%.

II.14.4. Unión de lectinas a la Sepharosa activada

10 ml de una solución de la lectina, de concentración 2.5 mg/ml, en tampón 0.1 M NaHCO₃, 1 M NaCl, 0.1 M -MDGP, pH 8.0, se incuban con 3 g de Sepharosa activada a 40C durante 16 h. Transcurrido este tiempo se neutralizan los grupos cianato todavía reactivos incubando durante 1 h más con 0.4 ml de etanolamina 100 mM pH 8.4. Seguidamente la Sepharosa se filtra y se lava con tampón 0.1 M NaHCO₃, 1 M NaCl, pH 8.0 (500 ml), agua destilada y, finalmente, tampón 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.8 ó 20 mM acetato sódico, 1 M NaCl, pH 5.2.

II.14.5. Unión de fibrinógeno a la Sepharosa activada

El fibrinógeno se ha unido a la Sepharosa activada en concentración aproximada de 2 mg/ml gel, siguiendo el método descrito en el apartado II.14.3. Finalmente, se ha determinado espectrofotométricamente la concentración exacta de fibrinógeno

unido a la Sepharosa. En estas condiciones el fibrinógeno queda anclado a la Sepharosa a través de sus dos cadenas , según se comprueba por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de muestras reducidas de Sepharosa-fibrinógeno.

III. RESULTADOS

III.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION Y LOCALIZACION DEL ACTIVADOR EN LA FIBRINOLISIS

III.1.1. Influencia de la concentración de activador en la fibrinólisis exógena

Se ha estudiado la influencia que la concentración del activador tiene en la fibrinólisis cuando éste se añade al coágulo ya formado. El estudio se ha realizado en plasma y en un sistema purificado, libre de inhibidores, en el que se ha mantenido la proporción plasminógeno:fibrinógeno (1:22 en peso) existente en el plasma (0.13-0.18 mg/ml de plasminógeno y 3-4 mg/ml de fibrinógeno). Se han utilizado dos modelos experimentales diferentes: coágulos retraídos, separados de la fase líquida, y coágulos intactos.

III.1.1.1. Coágulos retraídos

En un sistema purificado la eficacia de la lisis aumenta claramente al aumentar la concentración de estreptoquinasa de 0 a 10 UI/ml (Fig. 10). A partir de esta concentración el aumento en la velocidad de lisis (máximo % de material lisado por hora) es menor, llegando a estabilizarse prácticamente para 20-25 UI/ml de estreptoquinasa (velocidad de lisis de un 40% material lisado/h, aproximadamente) (Fig. 11).

La lisis de coágulos de plasma retraídos y lavados es mucho menor que la de coágulos de fibrina pura y no se ve apenas favorecida por el aumento de la concentración de activador, ya sea estreptoquinasa (hasta 200 UI/ml) (Fig.12,III) o uroquinasa (hasta 275 UI/ml) (Fig.13,III). En ningún caso se obtiene un porcentaje de material lisado superior al 20%, ni siquiera tras 21 h de lisis.

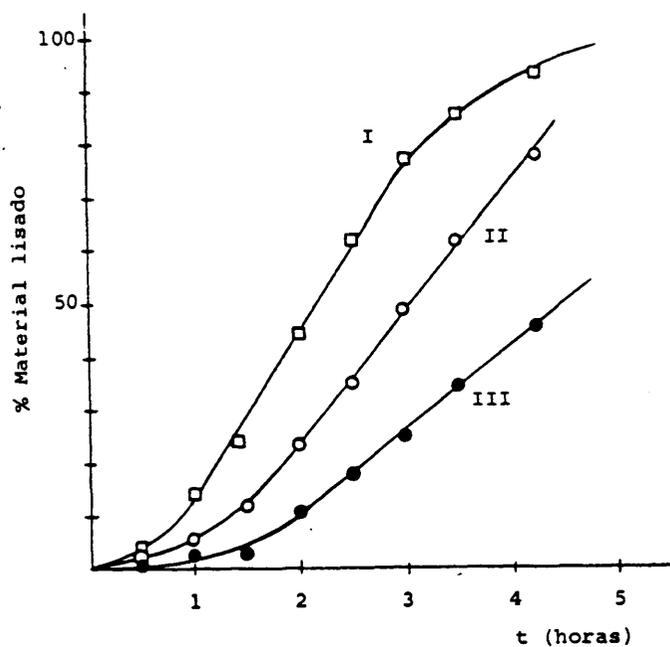


Figura 10. Cinéticas de lisis de coágulos de fibrina pura retraídos y lavados. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y la de plasminógeno de 0.045 mg/ml. La fibrinolisis se ha inducido por adición de 9 UI/ml (I), 5 UI/ml (II) y 1 UI/ml (III) de estrep-toquinasa.

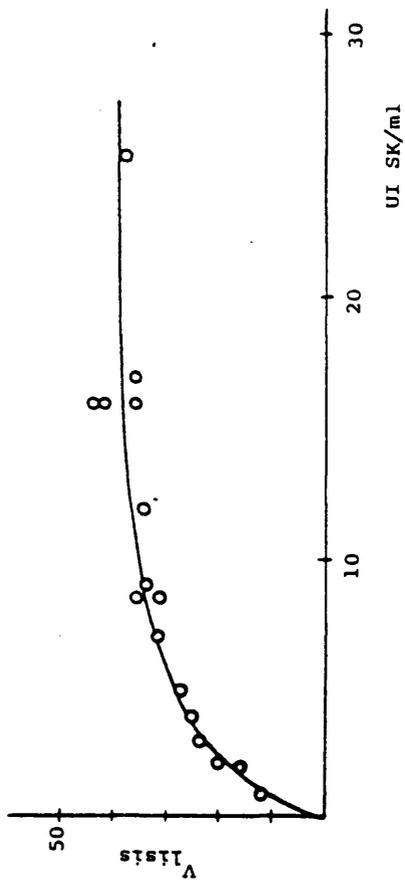


Figura 11. Variación de la velocidad de lisis (% material lisado/h) con la concentración de estreptoquinasa, para coágulos de fibrina pura retraídos y lavados. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y la de plasminógeno de 0.045 mg/ml.

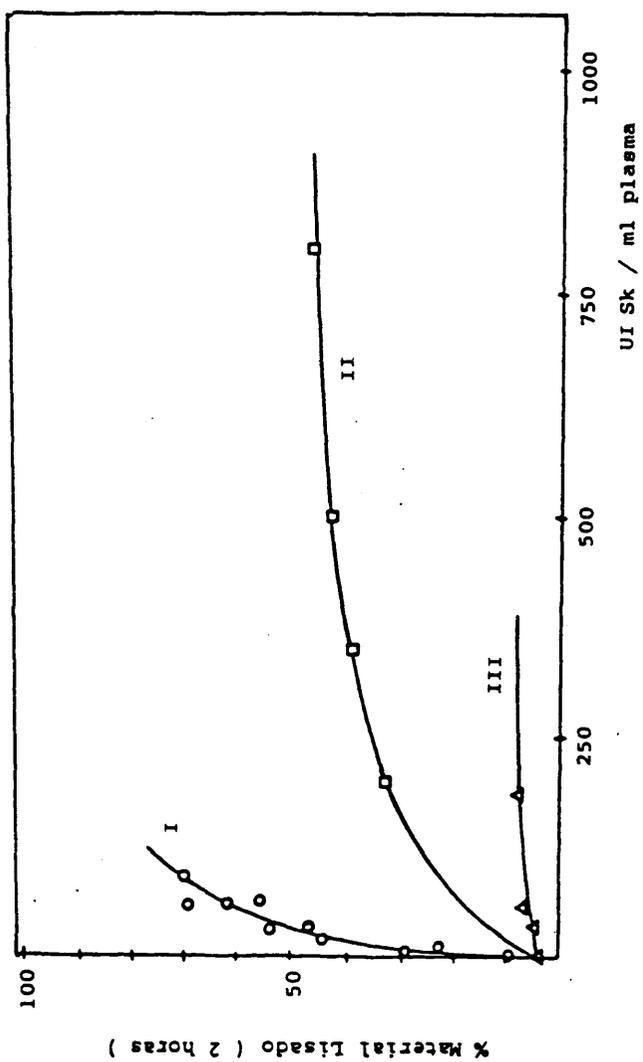


Figura 12. Efecto de la concentración de estreptoquinasa en la lisis de coágulos: I, de fibrina pura, retraídos y lavados; II, de plasma intactos; III, de plasma retraídos y lavados.

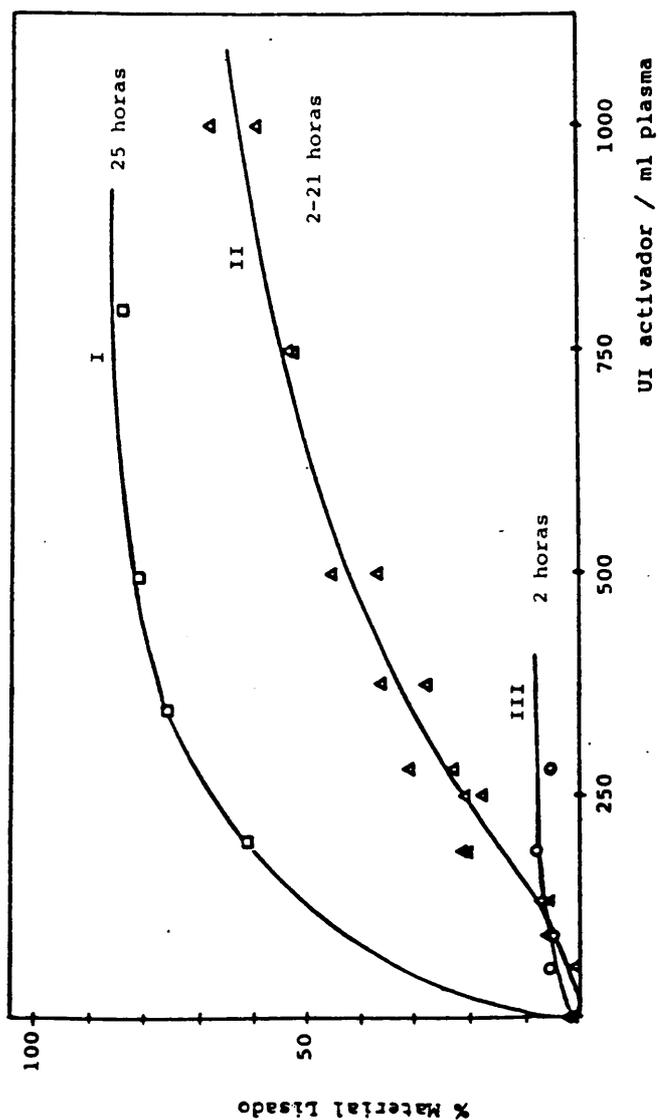


Figura 13. Efecto de la concentración de activador en la lisis exógena de coágulos de plasma. I, lisis de coágulos de plasma intactos inducida por adición de estreptoquinasa; II, lisis de coágulos de plasma intactos inducida por adición de uroquinasa; III, lisis de coágulos de plasma retraídos y lavados inducida por adición de uroquinasa.

III.1.1.2. Coágulos intactos

La efectividad de los dos activadores estudiados, estreptoquinasa y uroquinasa, es mucho mayor cuando se añaden directamente al coágulo ya formado, sin separarlo previamente de la fase líquida, que en la inducción de la lisis de coágulos re-traídos (Fig.12,II y 13,II). Al aumentar la concentración de estreptoquinasa se produce un claro aumento de la actividad fibrinolítica, la cual tiende a estabilizarse a partir de 500 UI/ml de plasma. La lisis de los coágulos puede llegar a ser total para tiempos de incubación superiores a las 25 h (Fig. 13,I).

La actividad fibrinolítica se ve también incrementada al aumentar la concentración de uroquinasa, si bien en este caso, en el rango de concentraciones estudiado (hasta 1000 UI/ml de plasma), no se observa una estabilización de la misma. Por otra parte, el porcentaje de material lisado es prácticamente el mismo a las 2 y 21 h de incubación, lo que indica una inhibición de la actividad fibrinolítica ya desde las 2 primeras horas de incubación. Por esta razón, si bien a concentraciones altas de activador (750-1000 UI/ml) y en las primeras horas de lisis la uroquinasa parece ser más efectiva que la estreptoquinasa, a tiempos altos ocurre lo contrario y los coágulos activados con uroquinasa no llegan a lisarse totalmente mientras que sí lo hacen aquellos activados con estreptoquinasa (comparar estreptoquinasa, Fig. 12,II y 13,I, con uroquinasa, Fig.13,II)

III.1.2. Influencia de la concentración de activador en la fibrinólisis endógena

Se ha estudiado la influencia que la concentración de activador tiene en la fibrinólisis cuando éste se encuentra presente en el momento de formarse la fibrina, tanto en plasma como en un sistema purificado.

El potencial fibrinolítico de la estreptoquinasa endógena es mucho mayor que el de la estreptoquinasa exógena, añadida a la fibrina ya formada, existiendo una acusada influencia de la concentración de activador en los tiempos totales de lisis. Así, para 0.5 UI/ml el tiempo total de formación y degradación de un coágulo de fibrina pura es de 85 min y este tiempo disminuye hasta 12 min al aumentar la concentración de estreptoquinasa a 10-15 UI/ml (Fig. 14 B).

El efecto es mucho mayor en la fibrinólisis endógena de coágulos de plasma, de forma que mientras el tiempo total de formación y lisis del coágulo en presencia de 20 UI/ml de estreptoquinasa es de 100 h, para 75 UI/ml es tan sólo de 30 min (Fig. 14 A). Para comprobar que este efecto no es debido a un incremento de la fibrinogenólisis se ha estudiado la variación con el tiempo del porcentaje de fibrina insoluble en el coágulo, para distintas concentraciones de estreptoquinasa (Fig. 15). A concentraciones altas de activador (90 UI/ml) la degradación es muy rápida y no se llega a obtener el 100% de fibrina en el coágulo, lo que indica claramente actividad fibrinogenolítica. Sin embargo, a concentraciones menores y precisamente en el intervalo en el que se produce más variación en los tiempos totales de lisis (45 y 35 UI/ml de plasma) el fibrinógeno se transforma totalmente en fibrina, ya que en la dos primeras horas de incubación el porcentaje de fibrina en el coágulo es del 100%.

Por lo que respecta a la uroquinasa, la presencia de la misma en el plasma antes de coagular, en concentraciones superiores a 250 UI/ml, provoca la disolución de la fibrina en tiempos inferiores a las 2 h. Sin embargo, una disminución de esta concentración tiene como resultado una reducción drástica de la actividad fibrinolítica y los coágulos así formados nunca llegan a lisarse totalmente.

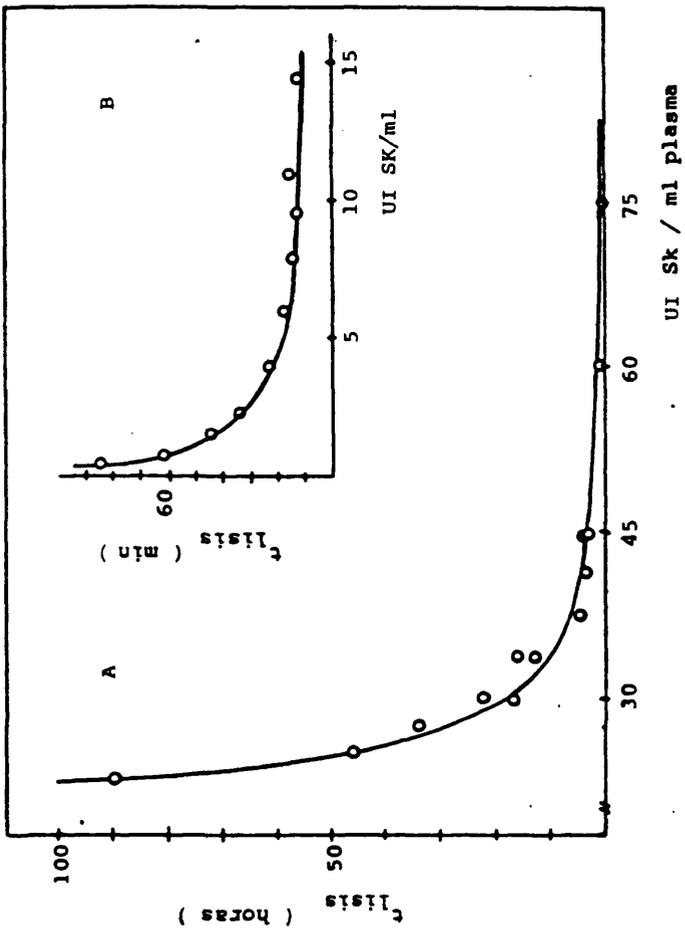


Figura 14. Efecto de la concentración de estreptoquinasa en la lisis endógena de coágulos de plasma (A) y de fibrina pura (B).

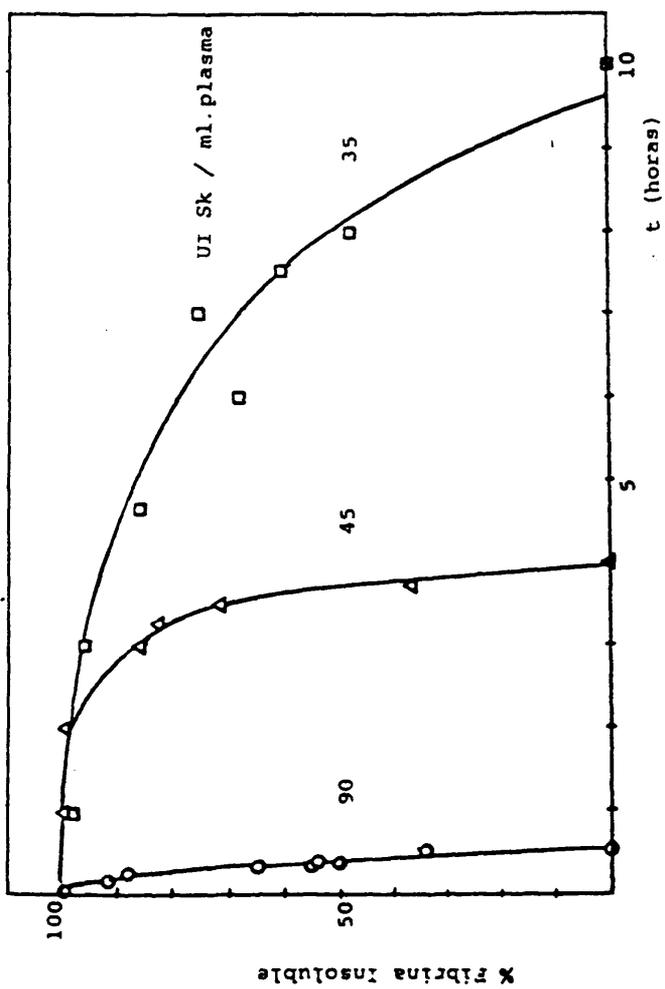


Figura 15. Disminución con el tiempo del porcentaje de fibrina insoluble en coágulos formados en presencia de concentraciones variables de estreptoquinasa.

III.2. CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS LECTINA-FIBRINOGENO / FRAGMENTOS D Y E

III.2.1. Unión de ¹²⁵I-Ac-Con A al fibrinógeno

La unión de ¹²⁵I-Ac-Con A al fibrinógeno se ha estudiado separando la lectina unida de la libre mediante coagulación del fibrinógeno y sus complejos por trombina. El porcentaje de unión inespecífica, determinado paralelamente en experimentos realizados en presencia del inhibidor específico α -MDGP, no ha superado en ningún caso el 7% de la unión total.

La representación de Scatchard de los datos experimentales (Fig. 16) puede ajustarse en principio a una recta con un coeficiente de correlación de 0.97 (y una desviación estandar con respecto a los valores de $\bar{v} / [\text{lectina}]_{\text{libre}}$, $\sigma = 0.05$). Se obtienen así 3.6 sitios de unión y una constante de disociación de 4.35 μM . Sin embargo, se obtiene un mejor ajuste considerando que existen dos clases de sitios de unión independientes y con distinta afinidad, siendo $n_1 = n_2 = 2$ y las constantes de disociación 2.4 μM y 16.6 μM , respectivamente ($\sigma = 0.018$).

En cualquier caso, la Ac-Con A se une a las 4 cadenas de carbohidrato del fibrinógeno, al igual que lo hiciera el dímero de Con A a pH 5.2 (249).

III.2.2. Unión de ¹²⁵I-lectinas a Sepharosa-fibrinógeno

A pH 5.2, el dímero de ¹²⁵I-Con A se une específicamente a Sepharosa-fibrinógeno. Ajustando a una recta la representación de Scatchard de los datos experimentales (coeficiente de correlación 0.92) se obtienen 3.9 sitios de unión con una constante de disociación de 3.6 μM (Fig. 17). Estos valores son muy similares a los obtenidos para la unión de Con A dímero

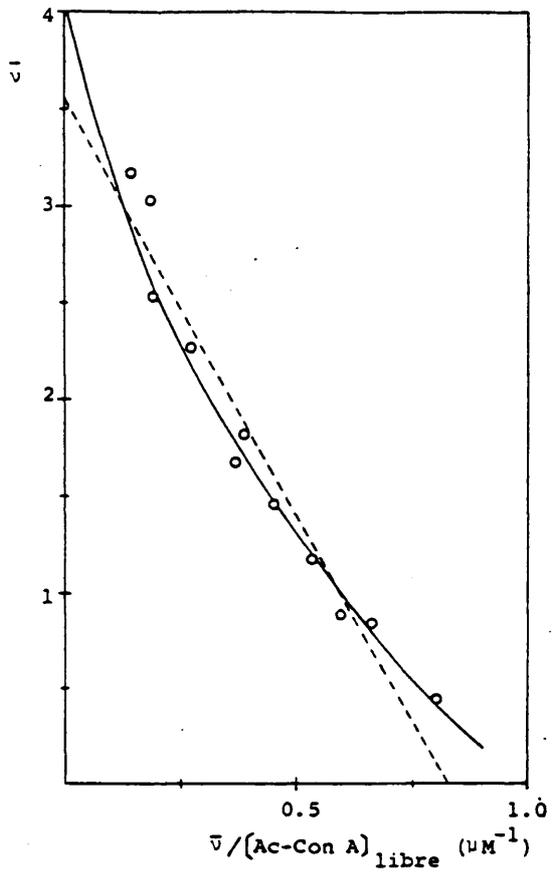


Figura 16. Representación de Scatchard de la unión específica de ^{125}I -Ac-Con A a fibrinógeno. El ajuste se ha realizado para una sola clase de sitios de unión (línea discontinua) y para dos clases de sitios de unión independientes (línea continua). La concentración de fibrinógeno es $2.5 \mu\text{M}$ y la de lectina varía de 2 a $28 \mu\text{M}$.

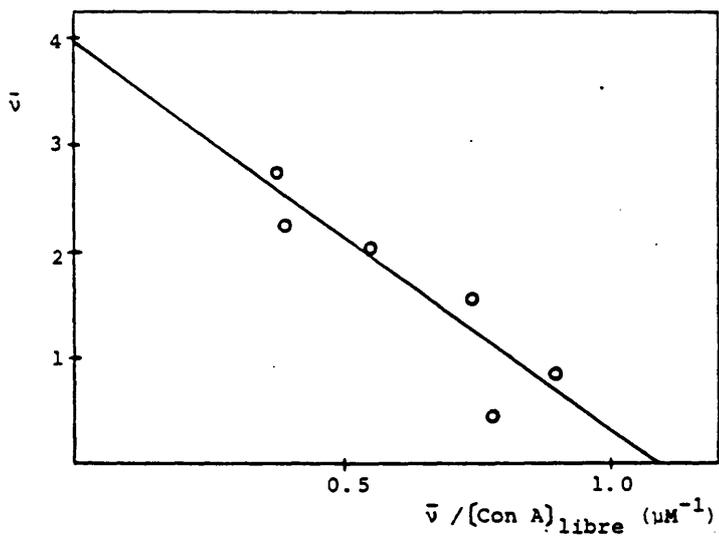


Figura 17. Representación de Scatchard de la unión específica de ^{125}I -Con A a Sepharosa-fibrinógeno a pH 5.2 (^{125}I -Con A dímero). La concentración de fibrinógeno es de $1.5 \mu\text{M}$ y la de lectina varía de 1.1 a $11.3 \mu\text{M}$

(249) y Ac-Con A al fibrinógeno.

Asimismo, el análisis de la unión de ^{125}I -Con A tetrámero, a pH neutro, a Sepharosa-fibrinógeno indica la existencia de 4.6 sitios de unión con una constante de disociación de $1.31 \mu\text{M}$ (coeficiente de correlación 0.85) (Fig.18).

No se observa, sin embargo, unión específica de ^{125}I -LcH a Sepharosa-fibrinógeno, detectándose sólo un 20% de unión inespecífica en todos los casos.

III.2.3. Estudios de ultracentrifugación analítica de los complejos lectina-fibrinógeno/fragmentos D y E

La interacción de las lectinas LcH, Con A y Ac-Con A con el fibrinógeno intacto y los fragmentos de digestión por plasmina D y E se ha estudiado por ultracentrifugación analítica. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

III.2.3.1 Complejos LcH-fibrinógeno

En el caso de los complejos LcH-fibrinógeno, obtenidos a concentraciones relativas de lectina de 50 μg a 1 mg por mg de fibrinógeno, se observa un pico cuyo coeficiente de sedimentación aparente varía desde 7.8 S para el fibrinógeno puro hasta 8.8 S para el complejo LcH-fibrinógeno a la mayor concentración relativa de lectina (1 mg/mg fibrinógeno). A esta concentración se observa también un pico más lento con un coeficiente de sedimentación de 3.9 S y que se corresponde con la lectina libre.

No se observan agregados solubles de alto peso molecular ni sedimentación de material antes de haberse alcanzado la fase

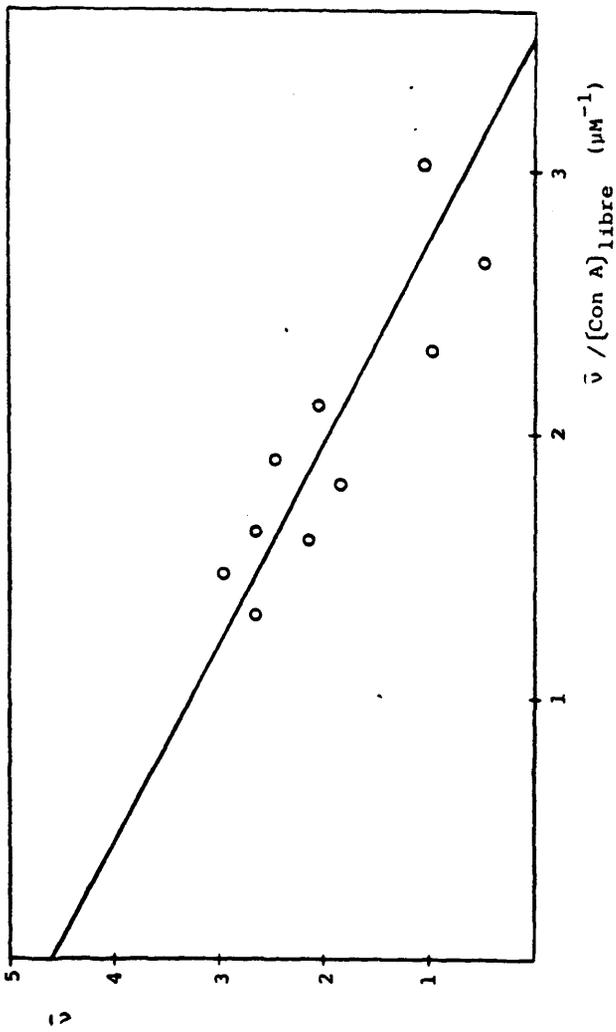


Figura 18. Representación de Scatchard de la unión específica de ^{125}I -Con A a Sephadex rosa-fibrinógeno a pH 7.8 (^{125}I -Con A tetramero). La concentración de fibrinógeno es de $1.6 \mu\text{M}$ y la de lectina varía de 0.8 a $6.4 \mu\text{M}$.

Tabla 3. Coeficientes de sedimentación de las distintas mezclas lectina-fibrinógeno/fragmentos D y E. Se dan desviaciones estandar cuando se han realizado más de 4 determinaciones.

	s (S)	Lectina	Concentración relativa	s (S)
Fibrinógeno	7.8±0.15	LcH	1 mg/mg Fibrinógeno	8.8±0.5
"		Ac-Con A	"	10.2
"		Con A T ^a	0.4 mg/mg Fibrinógeno	9.5, 13.5, 18.5, AG ^c
"		Con A D ^b	1 mg/mg Fibrinógeno	10.2±0.3
Fragmento D	4.9±0.14	LcH	1 mg/mg D	4.9±0.2
"		"	" + α-MDGP	4.4
"		"	" + Gal	5.0±0.1
"		Con A T	"	6.8-8.2
"		Ac-Con A	"	6.1
Fragmento E	2.9±0.05	LcH	0.7 mg/mg E	3.7±0.2
"		"	1 mg/mg E + α-MDGP	3.5
"		"	" + Gal	3.7±0.1
"		Con A T	0.7 mg/mg E	8.7, AG
"		Ac-Con A	0.5 mg/mg E	5.3

-100-

a) Ref. 237 b) Ref. 249 c) Agregados que sedimentan antes de alcanzarse 60 000 rev/min

de 60 000 rev/min.

III.2.3.2. Complejos Ac-Con A-fibrinógeno

Los complejos de Ac-Con A y fibrinógeno se mueven también en un solo pico cuyo coeficiente de sedimentación varía con la concentración de lectina desde 7.8 S hasta 10.2 S para los complejos formados a una concentración de Ac-Con A de 1 mg por mg de fibrinógeno. Este valor es muy similar al obtenido para los complejos Con A dímero-fibrinógeno, a pH ácido, para la misma concentración relativa de lectina (249). A esta concentración se observa además un pico que sedimenta a menor velocidad, con un coeficiente de sedimentación de 3.8 S, que corresponde al derivado acetilado dimérico de Con A.

En ningún caso se observa la formación de agregados de alto peso molecular.

III.2.3.3. Complejos Con A-fragmentos D y E

La formación de complejos entre los fragmentos D y E del fibrinógeno y Con A se demuestra claramente por ultracentrifugación analítica. Los fragmentos D y E puros muestran coeficientes de sedimentación de 4.9 S y 2.9 S, respectivamente. A altas concentraciones relativas de Con A (1 mg/mg D) todo el fragmento D se encuentra unido a la lectina y se observa un ancho pico que presenta al menos dos máximos con coeficientes de sedimentación de 6.8 S y 8.2 S, resultado del solapamiento de diferentes complejos Con A-fragmento D.

Por otra parte, a concentraciones menores (0.7 mg/mg E) Con A precipita la mayor parte de fragmento E y el material restante se mueve en un solo pico que presenta un coeficiente de sedimentación de 8.7 S, sin que pueda detectarse Con A libre o fragmento E libre.

III.2.3.4. Complejos Ac-Con A-fragmentos D y E

Ac-Con A interacciona con el fragmento D, de forma que a una concentración de lectina de 1 mg/mg D se observa un solo pico cuyo coeficiente de sedimentación, 6.1 S, es mayor que el que corresponde a cada proteína individualmente.

Igualmente, para los complejos Ac-Con A-fragmento E, a una concentración de lectina de 0.5 mg/mg E se observa un solo pico con un coeficiente de sedimentación de 5.3 S.

III.2.3.5. Complejos LcH-fragmentos D y E

La interacción de LcH con los fragmentos D y E es más difícil de detectar que en el caso de las otras lectinas. A altas concentraciones de lectina (1 mg/mg D) se observa para la mezcla de incubación LcH-fragmento D un solo pico que presenta un coeficiente de sedimentación de 4.9 S. Un comportamiento similar muestran las mezclas LcH-fragmento E, a concentraciones relativas de lectina de 0.7 mg/mg E. En este caso, el pico que se observa muestra un coeficiente de sedimentación de 3.7 S. Estos valores, en ambos casos, están muy próximos a los que corresponden a las especies moleculares individuales y pudieran representar el comportamiento de la mezcla en ausencia de complejos. Por ello se ha estudiado la velocidad de sedimentación de las mezclas de LcH y los fragmentos D y E en presencia del inhibidor específico (0.1 M α -MDGP) y en presencia de un azúcar no inhibidor (0.1 M galactosa). De esta forma se puede comparar en condiciones similares de viscosidad y densidad del disolvente el comportamiento de la mezcla en ausencia de complejos (α -MDGP) o en su posible presencia (galactosa).

Las mezclas de LcH y fragmento E muestran los mismos coeficientes de sedimentación, dentro del error experimental, con ambos azúcares: 3.5 S y 3.7 S en presencia de α -MDGP y galactosa, respectivamente. Sin embargo, las mezclas de LcH y fragmen

to D presentan coeficientes de sedimentación de 5.0 S en condiciones no inhibitoras y de 4.4 S en presencia de α -MDGP, lo que sugiere que pueda darse interacción entre LcH y el fragmento D.

III.2.4. Unión covalente de 125 I-Con A y 125 I-LcH al fibrinógeno

La identificación de los dominios con los que interacciona cada lectina en la molécula intacta de fibrinógeno se ha llevado a cabo uniendo covalentemente las 125 I-lectinas al fibrinógeno mediante un reactivo bifuncional de entrecruzamiento y digiriendo posteriormente el fibrinógeno con plasmina a fragmentos D y E. Estos reactivos son muy inestables y se inactivan rápidamente por lo que las disoluciones han de ser preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas. No obstante y para evitar que alguna posible actividad residual actúe uniendo la lectina marcada a los fragmentos del fibrinógeno una vez digerido éste por la plasmina, el reactivo se ha neutralizado totalmente con etanolamina antes de la digestión. La total inactivación del mismo se ha comprobado por la incapacidad del reactivo así tratado de unir covalentemente monómeros de 125 I-lectina entre sí, reacción en la que en nuestro sistema presenta el mayor rendimiento.

Con objeto de identificar más fácilmente los fragmentos unidos covalentemente a la lectina marcada se han realizado simultáneamente tres experimentos control: 125 I-lectina sola, 125 I-lectina más fragmento D y 125 I-lectina más fragmento E.

El reactivo DTBP une covalentemente dos monómeros de Con A entre sí, tanto los monómeros intactos, de 27 500 Da de peso molecular como los fragmentos de 13 000 a 18 000 Da, apareciendo una serie de bandas radiactivas de pesos moleculares hasta

55 000 Da. Estas bandas se encuentran presentes en todas las muestras y son altamente radiactivas, por lo que se ha cortado el gel justo por encima de ellas para evitar interferencias en la autorradiografía (Fig. 19 y 20).

El reactivo DTBP une covalentemente ^{125}I -Con A al fibrinógeno y a los fragmentos D y E, según se observa en la autorradiografía (Fig. 19, líneas 1, 2 y 3, respectivamente). En el caso de ^{125}I -Con A unida al fragmento D se observan dos bandas de pesos moleculares 100 000 Da y 115 000 Da, mientras que sólo se observa una banda de alrededor de 70 000 Da para ^{125}I -Con A unida al fragmento E. Por digestión del complejo covalente ^{125}I -Con A-fibrinógeno se obtienen las bandas radiactivas correspondientes a los complejos ^{125}I -Con A-fragmento D y ^{125}I -Con A-fragmento E (línea 5). Todas estas bandas reflejan unión específica, ya que no se observan en los experimentos realizados en presencia de α -MDGP.

El DTBP ha resultado, sin embargo, muy poco efectivo en la unión covalente de ^{125}I -LcH al fibrinógeno, por lo que para esta lectina se ha utilizado otro reactivo bifuncional, el DMS. Este reactivo también une covalentemente las subunidades de la ^{125}I -LcH, formando muy diversos complejos resultado de las distintas combinaciones de las dos clases de subunidades, H y L, de 18 000 Da y 8 000 Da, respectivamente, hasta la molécula completa H_2L_2 , de peso molecular 52 000 Da. Al igual que se hiciera en el caso de ^{125}I -Con A, los geles se han cortado justo por encima de estas bandas altamente radiactivas para evitar interferencias (Fig. 21 y 22).

El DMS une covalentemente ^{125}I -LcH al fibrinógeno y al fragmento D (Fig. 21, líneas 1 y 2, respectivamente). En el caso del complejo ^{125}I -LcH-fragmento D se observa una banda mayoritaria de peso molecular aproximado 105 000 Da y dos bandas

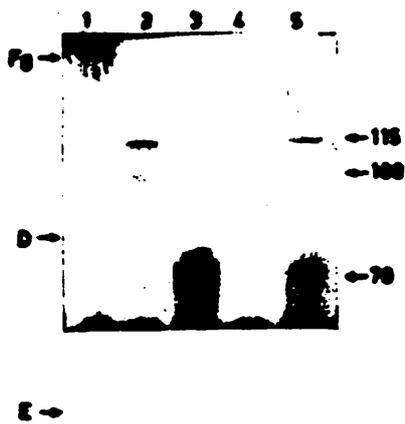


Figura 19. Unión covalente de ^{125}I -Con A al fibrinógeno y a sus fragmentos D y E por DTBP. Las distintas muestras se han analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS y las bandas radiactivas se han localizado por autorradiografía de los geles. La localización de los fragmentos D y E en el gel se indica mediante flechas, así como los pesos moleculares aproximados de las bandas radiactivas, calculados a partir de sus movilidades relativas. Línea 1, ^{125}I -Con A-fibrinógeno; línea 2, ^{125}I -Con A-fragmento D; línea 3, ^{125}I -Con A-fragmento E; línea 4, ^{125}I -Con A; línea 5, ^{125}I -Con A-fibrinógeno digerido por plasmina.

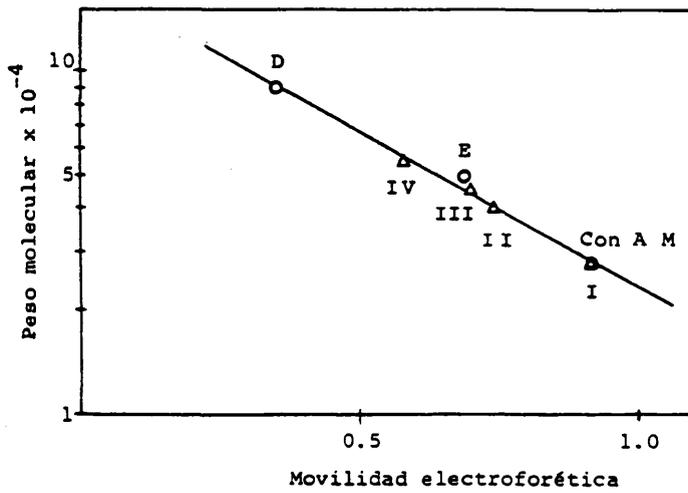


Figura 20. Movilidad electroforética de las bandas radiac-
tivas correspondientes a ¹²⁵I-Con A monómero y sus distin-
tos complejos covalentes formados por DTBP. I, ¹²⁵I-Con A
monómero, 27 500 Da; II, ¹²⁵I-Con A dímero, 27 500 +
13 000 Da; III, ¹²⁵I-Con A dímero, 27 500 + 18 000 Da; IV,
¹²⁵I-Con A dímero, 27 500 + 27 500 Da.

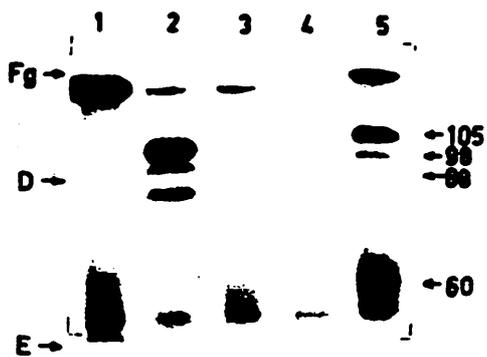


Figura 21. Unión covalente de ^{125}I -LcH al fibrinógeno y a sus fragmentos D y E por DMS. Las distintas muestras se han analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en presencia de SDS y las bandas radiactivas se han localizado por autorradiografía de los geles. La localización de los fragmentos D y E en el gel se indica mediante flechas, así como los pesos moleculares aproximados de las bandas radiactivas, calculados a partir de sus movilidades relativas. Línea 1, ^{125}I -LcH-fibrinógeno; línea 2, ^{125}I -LcH-fragmento D; línea 3, ^{125}I -LcH-fragmento E, línea 4, ^{125}I -LcH; línea 5, ^{125}I -LcH-fibrinógeno digerido por plasmina.

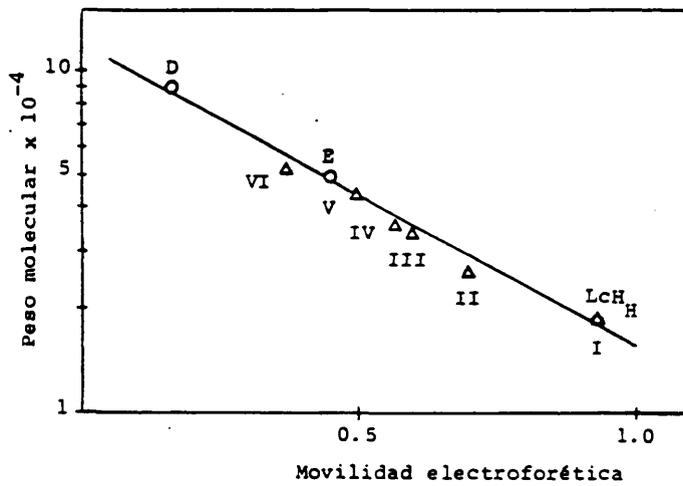


Figura 22. Movilidad electroforética de las bandas radiactivas correspondientes a la cadena pesada (H) de ^{125}I -LCH y a los distintos complejos covalentes de cadena pesada y cadena ligera (L) formados por DMS. I, H; II, HL; III, HL₂; IV, H₂; V, H₂L; VI, H₂L₂.

débiles de 98 000 y 88 000 Da, respectivamente, esta última con un alto grado de inespecificidad. Para la mezcla de ^{125}I -LcH y fragmento E sólo se observa una banda de peso molecular inferior a 60 000 Da que aparece también para el fibrinógeno intacto y que tiene carácter inespecífico (línea 3). Por digestión del complejo covalente ^{125}I -LcH-fibrinógeno se obtienen las bandas radiactivas correspondientes al complejo ^{125}I -LcH-fragmento D y una serie de bandas no identificadas de carácter inespecífico (línea 5).

III.2.5. Cromatografía de afinidad del fibrinógeno y sus fragmentos D y E en Sepharosa-lectina

El fibrinógeno es retenido por Sepharosa-Con A tanto a pH 7.8 como a pH 5.2, pudiendo ser eluido de la misma por α -MDGP 0.5 M (Fig. 23). La interacción entre el fibrinógeno y la lectina es, por lo tanto, de carácter específico y no se observan interacciones secundarias de naturaleza hidrofóbica, descritas en otros casos (251). Es necesario, sin embargo, utilizar una fuerza iónica alta para evitar que se den interacciones electrostáticas de carácter secundario.

Del mismo modo, el fragmento E se une específicamente a la lectina inmovilizada y puede ser eluido de la misma por 0.5 M α -MDGP. Sin embargo, el fragmento D no es retenido, apareciendo en su totalidad en el volumen de exclusión (Fig. 23).

En las mismas condiciones cromatográficas, la proporción de fibrinógeno retenido por Sepharosa-LcH es muy pequeña y no se observa retención de ninguno de los dos fragmentos, D o E.

III.3. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FIBRINOGENOLISIS Y EN LA DIGESTION DE MONOMEROS DE FIBRINA EN SOLUCION

La velocidad de aparición de los productos de degrada-

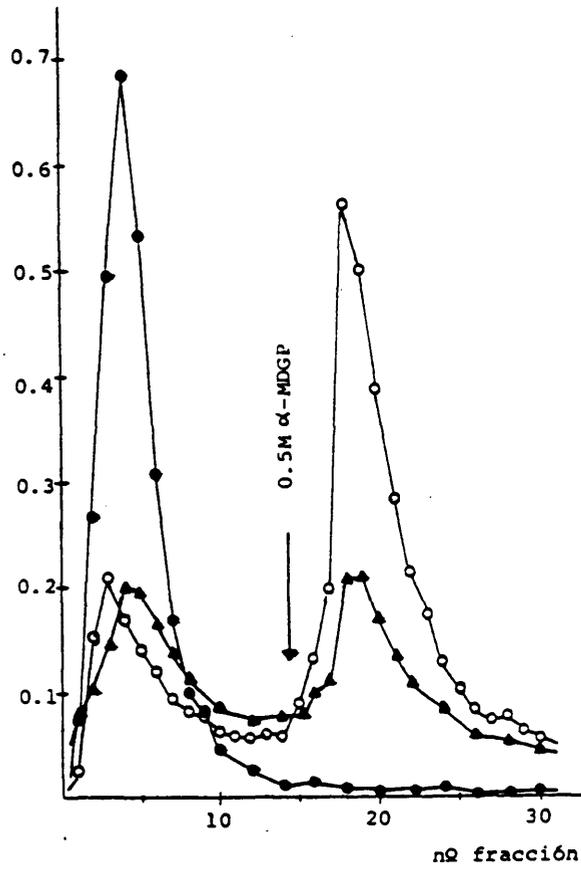


Figura 23. Cromatografía de afinidad del fibrinógeno y sus fragmentos D y E en Sepharosa-Con A a pH 7.8 y pH 5.2. O, fibrinógeno a ambos pHs; ●, fragmento D a ambos pHs; ▲, fragmento E a ambos pHs.

ción del fibrinógeno no se ve afectada por la presencia de Con A o LcH en concentraciones de hasta 0.5 mg/mg fibrinógeno. Tampoco se ve modificada la secuencia de aparición de dichos fragmentos ni su propia estructura.

De forma similar, la presencia de estas lectinas no modifica en forma alguna la digestión de monómeros de fibrina en solución.

III.4. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA COAGULACION

III.4.1. Efecto de la Ac-Con A en la velocidad de coagulación del fibrinógeno

La velocidad de agregación de monómeros de fibrina varía con la concentración relativa de lectina (Fig. 24 y 25). A bajas concentraciones de Ac-Con A (hasta 100 μ g/mg fibrinógeno) se observa una disminución de la velocidad de coagulación, proporcional a la concentración de lectina. A concentraciones mayores se produce, sin embargo, un aumento de la velocidad de coagulación, que llega a ser superior a la observada para la fibrina pura. Asimismo, se produce un acortamiento del tiempo de latencia existente tras la adición de trombina (Fig. 24).

El efecto de Ac-Con A sobre la velocidad de coagulación no se produce en presencia de 0.1 M α -MDGP añadido en la preincubación del fibrinógeno con la lectina.

III.4.2. Influencia de las lectinas en el porcentaje de proteína coagulable

Tanto Con A como LcH producen un aumento del porcentaje de proteína coagulable, que llega a ser del 100% a partir de concentraciones de 100 μ g de Con A ó 400 μ g de LcH por mg de



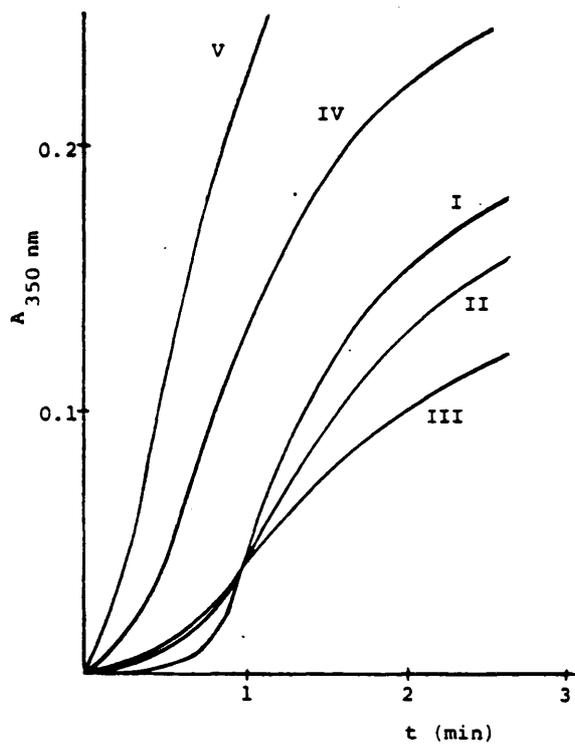


Figura 24. Cinéticas de coagulación del fibrinógeno y sus complejos con Ac-Con A. La concentración de fibrinógeno es de 0.5 mg/ml y la de trombina de 0.5 NIH/ml. I, fibrinógeno; II, 50 μ g Ac-Con A/mg fibrinógeno; III, 90 μ g Ac-Con A/mg fibrinógeno; IV, 360 μ g Ac-Con A/mg fibrinógeno; V, 900 μ g Ac-Con A/mg fibrinógeno.

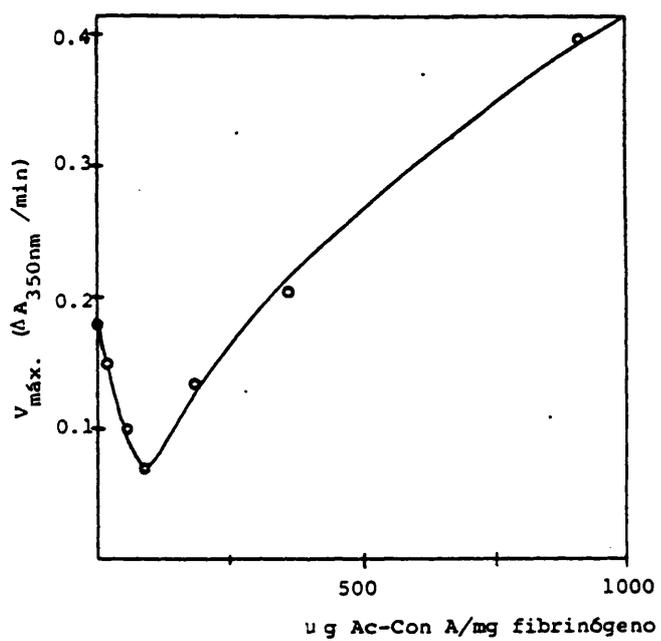


Figura 25. Variación de la velocidad máxima de agregación del fibrinógeno tras la adición de trombina en función de la concentración de Ac-Con A.

fibrinógeno. Este efecto no es cuantitativamente muy importante, ya que el fibrinógeno de partida presenta una coagulabilidad del 95-98%, aunque sí lo es cualitativamente en el sentido de que en ningún caso se produce una disminución del porcentaje de proteína coagulable.

III.4.3. Influencia de las lectinas en el tramado de la fibrina

La relación entre cadenas γ y dímeros γ - γ , y cadenas α y polímeros α no se ve afectada por la presencia de Ac-Con A o LcH en el gel de fibrina, a diferencia de la inhibición del tramado producida por Con A (237).

(El efecto de Con A y LcH en el grado de entrecruzamiento de la fibrina se puede observar en las figuras 31 y 32, respectivamente, a tiempo cero)

III.5. EFFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FIBRINOLISIS

III.5.1. Fibrinólisis exógena

Se ha estudiado el efecto de las lectinas en la fibrinólisis exógena de coágulos de fibrina pura tanto retraídos como intactos.

III.5.1.1. Coágulos retraídos

La presencia de Con A en el coágulo tiene como resultado una clara inhibición de la fibrinólisis, proporcional a la concentración de lectina (Fig. 26). Este efecto no se observa en presencia de α -MDGP.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de muestras totales (sobrenadante y coágulo)

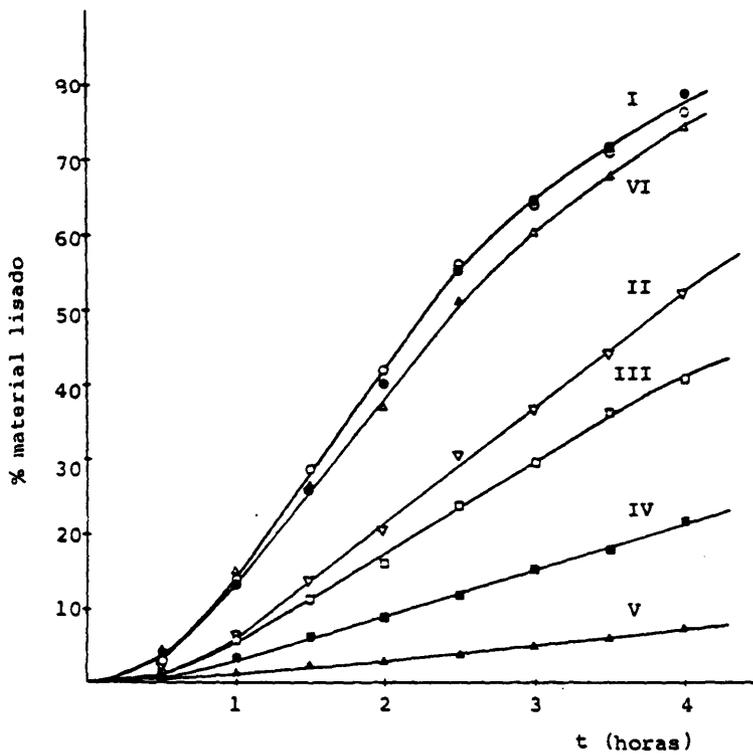


Figura 26. Inhibición por Con A de la lisis de coágulos re-
traídos y lavados inducida por adición de estreptoquinasa
(19 UI/ml). La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y
la de plasminógeno de 45 μ g/ml. I, fibrina pura (o) y en
presencia de α -MDGP (\bullet); II, 20 μ g Con A/mg fibrinógeno;
III, 60 μ g Con A/mg fibrinógeno; IV, 120 μ g Con A/mg fibri-
nógeno; V, 200 μ g Con A/mg fibrinógeno; VI, 200 μ g Con A/mg
fibrinógeno en presencia de α -MDGP.

tomadas a distintos tiempos de digestión indica que la secuencia de aparición de los productos de degradación de la fibrina no se ve modificada por la presencia de la lectina, aunque sí disminuye ostensiblemente la velocidad de aparición de los mismos (Fig. 27).

El efecto de inhibición producido por Ac-Con A sobre la velocidad de lisis es muy similar al observado para Con A mientras que la inhibición producida por LcH es sensiblemente menor (Fig. 28). Así, se observa un 50% de inhibición para 45 μ g de Con A ó 70 μ g de Ac-Con A añadidos por mg de fibrinógeno (tomando como 100% de velocidad de lisis la que presenta un coágulo de fibrina pura), mientras que es necesario añadir 600 μ g de LcH por mg de fibrinógeno para observar este efecto. Un aumento de la concentración de LcH no produce una inhibición mayor de la velocidad de lisis. Por el contrario, a medida que aumenta la concentración de Con A o Ac-Con A disminuye progresivamente la velocidad de lisis, alcanzándose hasta un 95% de inhibición. El efecto de las tres lectinas puede compararse más correctamente teniendo en cuenta la distinta afinidad de cada una de ellas y representando el porcentaje de velocidad de lisis en función de la concentración de lectina unida al fibrinógeno (función de saturación) (Fig. 29).

El número de moles de lectina unidos por mol de fibrinógeno se ha calculado utilizando unas constantes de disociación de 0.35 μ M para Con A ($n = 2$) (237), 2.6 μ M para LcH ($n = 2$) (250) y 4.35 μ M para Ac-Con A ($n = 4$) (III.2.1.). Así se observa que se alcanza un 50% de inhibición cuando se unen 0.15 moles de Con A, 0.3 moles de Ac-Con A ó 1.5 moles de LcH por mol de fibrinógeno.

Ninguna de las tres lectinas produce inhibición de la lisis en presencia de α -MDGP. Por otra parte, la elución por 0.2 M α -MDGP de las lectinas unidas a la fibrina revierte la inh.-

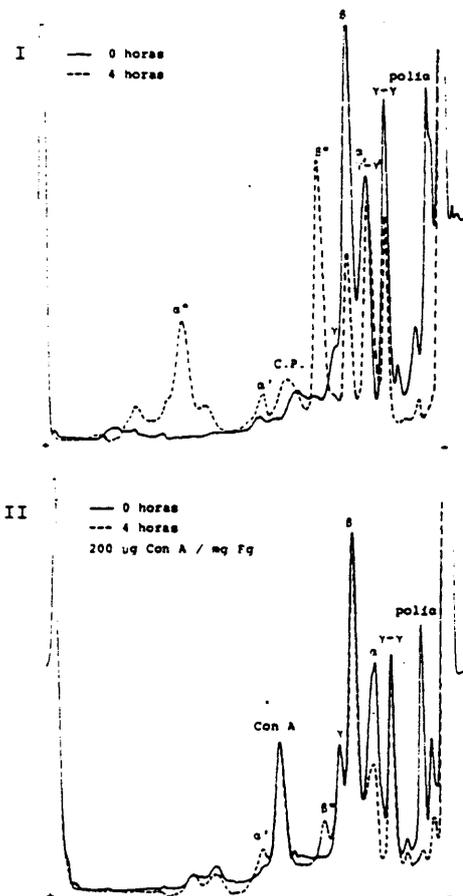


Figura 27. Densitometrado de las bandas de protefna co rrespondientes a fibrina (0 horas) y a sus productos de degradaci3n por plasmina (4 horas) separados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en condiciones reductoras. I, fibrina; II, Con A-fibrina.

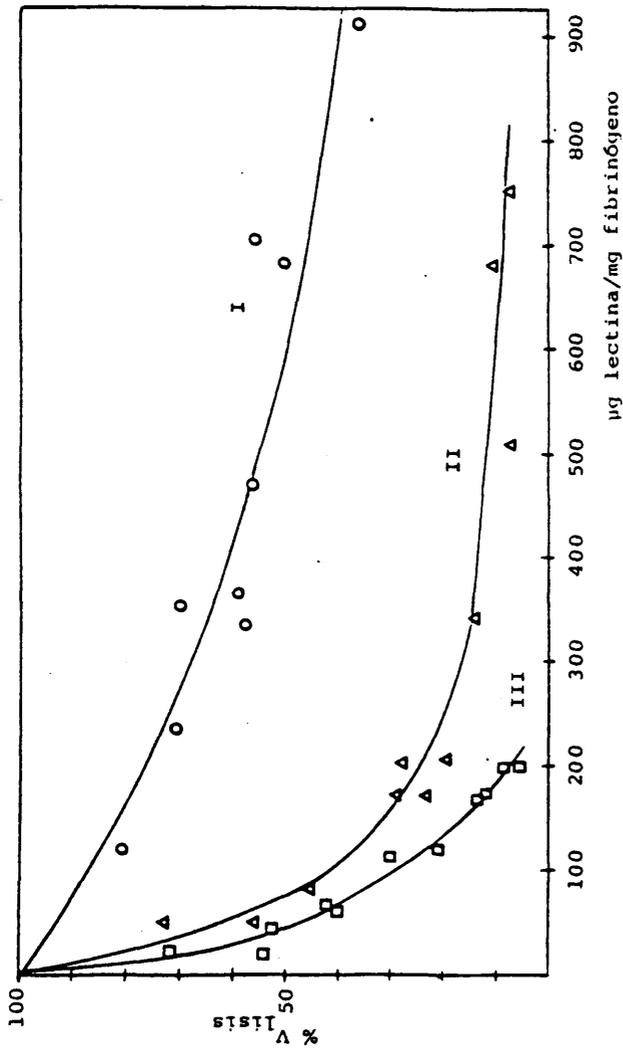


Figura 28. Variación con la concentración de lectina del porcentaje de velocidad de lisis de coágulos retraídos y lavados, tomando como 100% la velocidad de lisis de un coágulo de fibrina pura. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y la de plasminógeno de 45 µg/ml. La lisis se ha inducido por adición de 19 UI/ml de estreptoquinasa. I. C.H. II. AC-CON A. III. CON A.

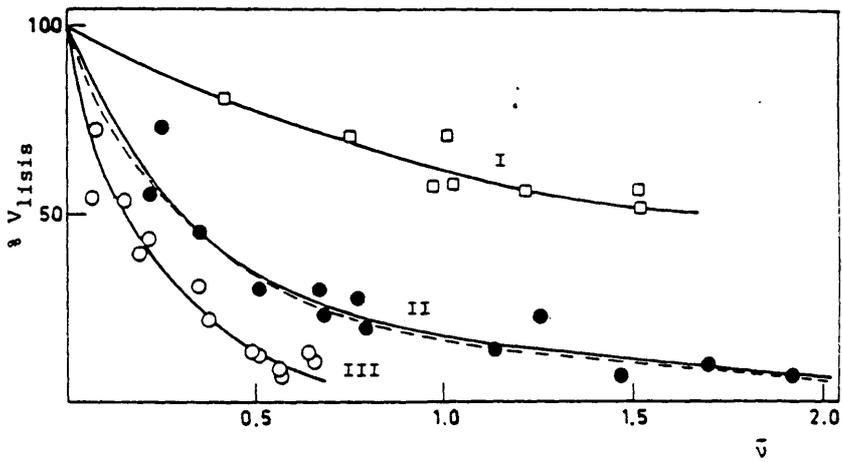


Figura 29. Relación entre la cantidad de lectina unida al fibrinógeno y el porcentaje de velocidad de lisis. La función de saturación se ha calculado utilizando unas constantes de disociación de $0.35 \mu\text{M}$ para Con A ($n = 2$), $2.6 \mu\text{M}$ para LcH ($n = 2$) y $4.35 \mu\text{M}$ para Ac-Con A ($n = 4$). I, LcH; II, Ac-Con A; III, Con A. La línea discontinua representa los valores de Con A corregidos teniendo en cuenta la bivalencia de la lectina.

bición de la fibrinolisis proporcionalmente a la cantidad de lectina eluida. En el caso de coágulos formados en presencia de 600 μg de LcH por mg de fibrinógeno, se recupera fácilmente el 95% de la velocidad de lisis. Sin embargo, en el caso de coágulos formados en presencia de 200 μg de Con A por mg de fibrinógeno la elución de la lectina es más difícil y, por lo tanto, la recuperación de la velocidad de lisis (la permanencia en el coágulo de sólo 15 μg de lectina produce una inhibición del 75%).

Se ha estudiado también el efecto producido por Con A en la fibrinolisis exógena de coágulos retraídos, obtenidos en presencia de Lys-plasminógeno, y activados con estreptoquinasa. Los coágulos se han preparado sustituyendo el Glu-plasminógeno por Lys-plasminógeno siguiendo exactamente el protocolo ya descrito (II.9.1.). La presencia de Con A en el coágulo (200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fibrinógeno) produce una clara inhibición de la fibrinolisis (Fig. 30), similar a la observada en la lisis por Glu-plasminógeno.

III.5.1.2. Coágulos intactos

La presencia de Con A en el coágulo produce una inhibición de la velocidad de lisis, proporcional a la concentración de lectina, sin alterar el orden de aparición de los productos de digestión de la fibrina (Fig. 31). Después de 3 h de incubación con estreptoquinasa, la cantidad de cadena β y dímeros γ - γ , así como de cadena γ que permanecen sin degradar es muy alta si se compara con el control de fibrina pura.

En el caso de la LcH, sin embargo, el efecto sobre la fibrinolisis es prácticamente nulo, incluso a concentraciones de lectina de 1 mg/mg fibrinógeno (Fig. 32), al menos después de 3 h de incubación con estreptoquinasa.

III.5.2. Fibrinolisis endógena

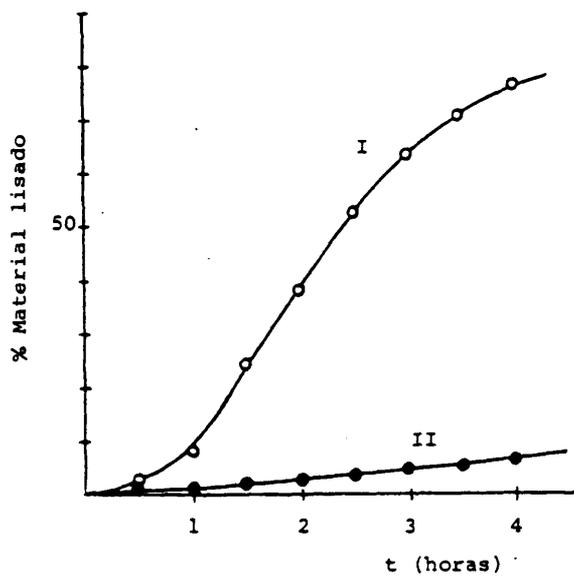


Figura 30. Inhibición por Con A de la lisis de coágulos retraídos, obtenidos en presencia de Lys-plasminógeno, y activados por estreptoquinasa (19 UI/ml). La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y la de Lys-plasminógeno de 45 µg/ml. I, fibrina pura; II, 200 µg Con A/mg fibrinógeno.

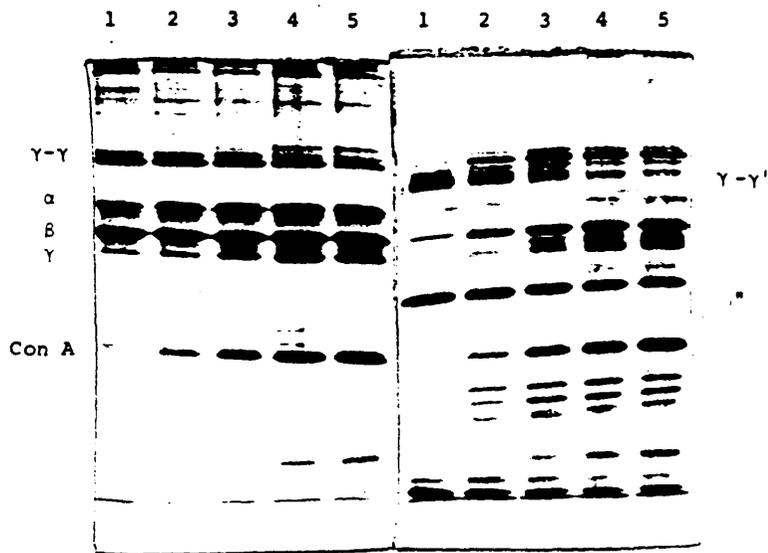


Figura 31. Electroforesis en gel de poliacrilamida de c6gu-
los intactos digeridos por plasmina en presencia de diferen-
tes concentraciones de Con A. La concentraci6n de fibrin6geno
es de 1 mg/ml y la de plasmin6geno de 15 ug/ml. La fibrinoli-
sis se ha inducido por adici6n de 19 UI/ml de estreptoqinasa.
Las muestras de co6gulos totales, tomadas a 0 y 3 horas de di-
gesti6n, se han separado por electroforesis en geles de polia-
crilamida al 12% en condiciones reductoras. L6nea 1, fibrina
pura; l6nea 2, 40 ug Con A/mg fibrin6geno; l6nea 3, 130ug
Con A/mg fibrin6geno; l6nea 4, 220 ug Con A/mg fibrin6gno;
l6nea 5, 350 ug Con A/mg fibrin6geno.

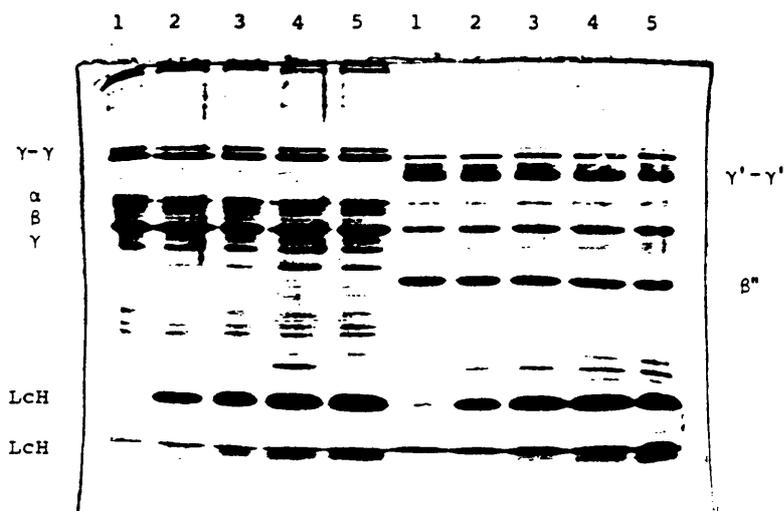


Figura 32. Electroforesis en gel de poliacrilamida de coágulos intactos digeridos por plasmina en presencia de diferentes concentraciones de LcH. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml y la de plasminógeno de 15 μ g/ml. La fibrinólisis se ha inducido por adición de 19 UI/ml de estreptoquinasa. Las muestras de coágulos totales, tomadas a 0 y 3 horas de digestión, se han separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Línea 1, fibrina pura; línea 2, 300 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 3, 600 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 4, 900 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 5, 1.2 mg/mg fibrinógeno.

En presencia de Con A la velocidad de lisis de los coágulos en formación es menor que en su ausencia y es tanto más pequeña cuanto mayor es la concentración de lectina (Fig. 33). Sin embargo, este efecto de inhibición es menor que el producido en la lisis de coágulos ya formados. Después de 90 min de incubación con estreptoquinasa todavía se observan dímeros γ - γ y cadenas β y γ sin degradar en los coágulos formados en presencia de concentraciones de Con A superiores a 130 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fibrinógeno. La cadena α presente a los 10 min de incubación está totalmente degradada incluso a altas concentraciones de lectina.

Por el contrario, la LcH sólo produce una inhibición muy débil de la fibrinólisis endógena que únicamente se aprecia a los 10 min de incubación con estreptoquinasa (Fig. 34).

III.6. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA UNIÓN DE PLASMINOGENO A FIBRINA

III.6.1. Unión de ¹²⁵I-plasminógeno a fibrina

La radiactividad del sobrenadante de los coágulos obtenidos en presencia de Con A (20-250 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fibrinógeno) o LcH (50-1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fibrinógeno) es muy similar a la del sobrenadante de coágulos control preparados en ausencia de lectinas. En todos los casos se encuentra presente en el sobrenadante un $55 \pm 5\%$ del plasminógeno total, es decir, un 45 % del plasminógeno ha de estar retenido en el coágulo. Una vez retraídos y lavados los coágulos sólo un $27 \pm 3\%$ de plasminógeno permanece unido a la fibrina, tanto en presencia como en ausencia de lectinas, según se comprueba por medida de la radiactividad total de los coágulos.

III.6.2. Elución de plasminógeno unido a la fibrina

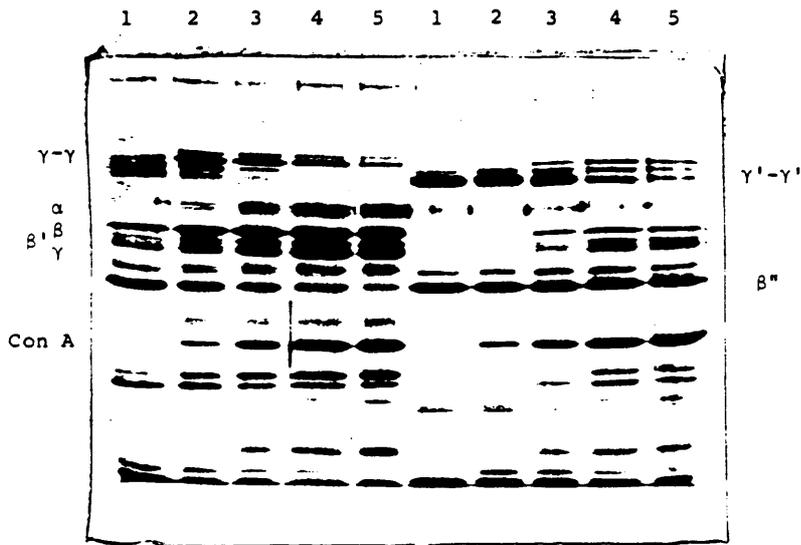


Figura 33. Electroforesis en gel de poliacrilamida de coágulos intactos digeridos por plasminógeno activado por estreptoquinasa endógena en presencia de diferentes concentraciones de Con A. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml, la de plasminógeno de 15 μ g/ml y la de estreptoquinasa de 19 UI/ml. Las muestras de coágulos totales, tomadas a 10 y 90 minutos de digestión, se han separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Línea 1, fibrina pura; línea 2, 40 μ g Con A/mg fibrinógeno; línea 3, 130 μ g Con A/mg fibrinógeno; línea 4, 220 μ g Con A/mg fibrinógeno; línea 5, 350 μ g Con A/mg fibrinógeno.

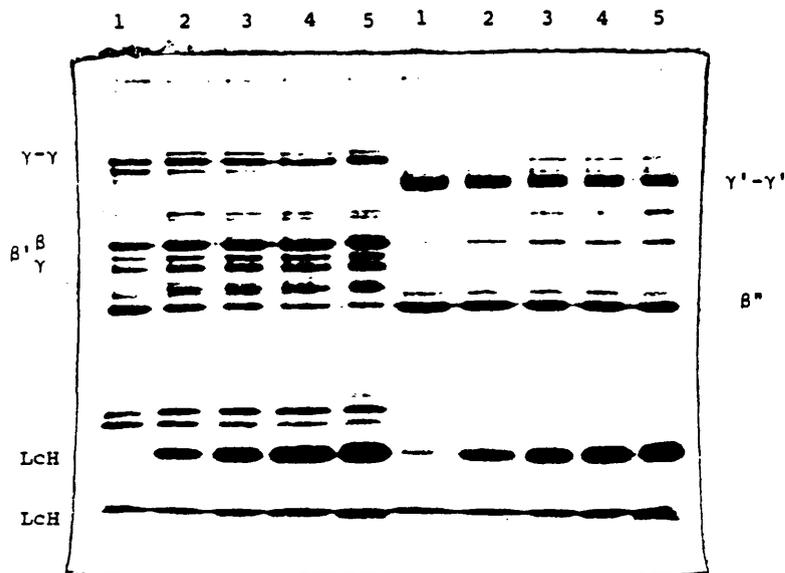


Figura 34. Electroforesis en gel de poliacrilamida de coágulos intactos digeridos por plasminógeno activado por estreptoquinasa endógena en presencia de diferentes concentraciones de LcH. La concentración de fibrinógeno es de 1 mg/ml, la de plasminógeno de 15 μ g/ml y la de estreptoquinasa de 19 UI/ml. Las muestras de coágulos totales, tomadas a 10 y 50 minutos de digestión, se han separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Línea 1, fibrina pura; línea 2, 300 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 3, 600 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 4, 900 μ g LcH/mg fibrinógeno; línea 5, 1.2 mg LcH/mg fibrinógeno.

La influencia de las lectinas en la unión de plasminógeno a la fibrina se ha estudiado también eluyendo el zimógeno frío unido a la fibrina con ácido ϵ -aminocaproico. No se observan diferencias significativas entre la cantidad de plasminógeno eluido de un coágulo control, formado en ausencia de lectinas y el eluido de un coágulo formado en presencia de lectinas, ya sea Con A o LcH, y se trate tanto de Glu- como de Lys-plasminógeno.

III.7. EFECTO DE LAS LECTINAS EN LA FORMACION Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO PLASMINOGENO-ESTREPTOQUINASA

La incubación previa del plasminógeno con Con A (20-250 μ g/ml) o LcH (50 μ g-1 mg/ml) no influye apreciablemente en la actividad del complejo plasminógeno-estreptoquinasa en las condiciones estudiadas (0.015 mg/ml de plasminógeno y 19 UI/ml de estreptoquinasa), similares a las utilizadas en los estudios de fibrinólisis. En ningún caso se observa una disminución de la actividad del complejo ni se ve inhibida su formación en presencia de las lectinas, incluso a concentraciones de hasta 250 μ g/ml de Con A ó 1 mg/ml de LcH en las que los efectos de inhibición de la fibrinólisis alcanzan sus respectivos máximos para cada lectina.

-128-

IV. DISCUSSION

IV.1. IMPORTANCIA DE LA CONCENTRACION Y LOCALIZACION DEL ACTIVADOR EN LA FIBRINOLISIS

Para que la fibrinólisis tenga lugar rápida y selectivamente, la activación del plasminógeno ha de producirse en la superficie de la fibrina. La interacción específica del plasminógeno con su activador y con la fibrina es, por lo tanto, de crucial importancia en la regulación del proceso fibrinolítico. Por ello se ha estudiado la influencia que la localización y concentración del activador tiene en la fibrinólisis, tanto en plasma como en un sistema purificado libre de inhibidores. Se han utilizado tres modelos experimentales diferentes:

- Activación exógena de coágulos retraídos. Los coágulos una vez formados se separan de la fase líquida eliminando así del medio el plasminógeno no unido a la fibrina.

- Activación exógena de coágulos intactos. En este caso, los coágulos no son previamente separados de la fase líquida, por lo que en el medio de lisis se encuentra presente todo el plasminógeno existente inicialmente al formarse la fibrina, en parte unido a la fibrina y en parte en la fase líquida circundante.

- Activación endógena. Los coágulos se preparan en presencia del activador, de forma que los procesos de coagulación y fibrinólisis se disparan simultáneamente.

En plasma normal, la afinidad del plasminógeno nativo hacia la fibrina parece ser muy pequeña. Los niveles de plasminógeno en plasma y suero son muy similares (210, 252) y la incorporación de plasminógeno a la fibrina durante el proceso de coagulación es solamente de un 4% (175). De hecho este plasminógeno es insuficiente para lisar los coágulos retraídos al ser activado por estreptoquinasa o uroquinasa. Asimismo, los bajos

porcentajes de lisis observados no dependen prácticamente de la concentración de activador, indicando que la concentración de plasminógeno unido a la fibrina es, en este caso, el factor limitante de la lisis.

En sistema purificado, sin embargo, la unión de Glu-plasminógeno a la fibrina es sensiblemente mayor para la misma proporción plasminógeno:fibrinógeno existente en plasma. En nuestras condiciones experimentales, aproximadamente un 27% del plasminógeno (12 μ g) permanece unido a la fibrina en coágulos retraídos y lavados, de acuerdo con otros valores dados en la bibliografía (242, 253). Esta diferencia entre plasma y sistema purificado pone de manifiesto la importancia que los inhibidores naturales del plasma, especialmente la α_2 -antiplasmina, tienen no sólo en la inhibición de la plasmina sino también en la supresión de la unión del plasminógeno a la fibrina (100, 170).

Por otra parte, la velocidad de lisis de coágulos retraídos de fibrina pura aumenta proporcionalmente con la concentración de estreptoquinasa exógena, hasta llegar a un valor máximo para una concentración de estreptoquinasa alrededor de 20 UI/ml (0.05 mg/ml). Este máximo de actividad fibrinolítica sólo se alcanza al añadir un exceso del activador (7-8 moles de estreptoquinasa por mol de plasminógeno). Dada la gran afinidad de la estreptoquinasa por el plasminógeno (254, 255), este hecho sugiere que la eficacia de la fibrinólisis exógena depende en gran medida de la capacidad del activador para difundir al interior del coágulo.

La lisis de coágulos intactos es mucho más rápida que la lisis de coágulos retraídos y lavados, independientemente de cual sea el activador utilizado. A pesar de que en el primer caso en el momento de la lisis existen los inhibidores del

plasma en su totalidad. El plasminógeno no unido inicialmente a la fibrina, presente en la fase líquida circundante, es, por lo tanto, de una gran efectividad en la fibrinólisis y la difusión del plasminógeno al interior del trombo puede ser un factor muy importante en la terapia trombolítica.

Se ha observado, de hecho, que los niveles de plasminógeno circulante son un factor determinante de la trombolisis. Por ejemplo, en el tratamiento de la trombosis venosa iliofemoral con estreptoquinasa, los niveles de plasminógeno en aquellos pacientes resistentes a la terapia o que pronto desarrollan una trombosis recurrente son significativamente menores que los de pacientes tratados con éxito (256).

Asimismo, mientras que la adición de activador a coágulos lavados no provoca la lisis de los mismos, ésta sí se consigue por adición de una mezcla de activador y suero (257). Por otra parte, en un sistema purificado, la inmersión de un coágulo de fibrina pura en una solución de estreptoquinasa seguida de inmersión en una solución de plasminógeno proporciona una lisis mucho más eficaz de los coágulos que el procedimiento inverso (253, 258).

Todos estos resultados parecen sugerir que la unión del plasminógeno en sí no es un factor determinante de la lisis. Sin embargo, pueden ser interpretados de una forma totalmente diferente como un indicativo de que aquellas condiciones que favorecen la unión del plasminógeno a la fibrina son las que proporcionan los mejores niveles de lisis. En este sentido, se ha demostrado recientemente que los activadores juegan un papel regulador de la unión del plasminógeno a la fibrina al promover, vía plasmina, la exposición de nuevos sitios de unión en la fibrina parcialmente degradada (224, 225, 259). La unión de Glu-plasminógeno a la fibrina en presencia del activador tiene lugar en asociación con la formación de plasmina y la li

sis del coágulo. A su vez, la modificación proteolítica de la fibrina por acción de la plasmina produce un aumento de la unión de Glu-plasminógeno a la fibrina así como de su activación a plasmina. Este efecto es máximo en los primeros pasos de la proteólisis y parece estar asociado con la formación de polímero X (260).

Aunque es un hecho claro que la infusión de uroquinasa "in vivo" produce un rápido incremento de la actividad fibrinolítica, este efecto es muy poco duradero, debido aparentemente a la desaparición de la uroquinasa de la circulación por mecanismos hasta ahora desconocidos. Dada la gran variedad de inhibidores capaces de interactuar con la uroquinasa: antitrombina III (261, 262), α_1 -antitripsina (263), α_2 -macroglobulina (262, 264) y α_2 -antiplasmina (163), parece razonable suponer que la neutralización de este activador tiene lugar en un primer paso por formación de complejos con dichos inhibidores y que estos complejos son posteriormente eliminados de la circulación. En nuestro caso, la inhibición de la uroquinasa parece ser total en las 2 primeras horas de incubación ya que a tiempos más altos (hasta 21 horas) no se produce ningún aumento en los porcentajes de lisis. Este hecho refleja también una inactivación de la plasmina formada, debido a su unión a los inhibidores o bien a otros factores como pueden ser la autodigestión, inestabilidad a pH neutro, etc..

Sin embargo, la lisis de coágulos intactos inducida por estreptoquinasa prosigue normalmente con el tiempo de incubación hasta la disolución del coágulo, sin que se produzca inactivación de la plasmina.

La formación del complejo plasmina- α_2 -antiplasmina depende en gran medida de la disponibilidad de sitios de unión de lisina libres, de forma que la plasmina unida a la fibrina no

es prácticamente reactiva hacia el inhibidor en comparación con la enzima libre (174). La unión de la plasmina a la estreptoquinasa, si bien no está mediada por los sitios de unión de lisina, impide también su interacción con α_2 -antiplasmina (255 265) y, por otra parte, parece producir un aumento de la afinidad del complejo por la fibrina con respecto al plasminógeno/plasmina libre (266). De esta forma, la plasmina se encuentra mucho más protegida frente a la inhibición por α_2 -antiplasmina que cuando la activación se produce por uroquinasa y ello hace que, especialmente a tiempos altos de incubación, la uroquinasa sea menos efectiva en la lisis que la estreptoquinasa para las mismas unidades de activador.

Por otra parte, la competencia existente entre el inhibidor y el activador por el plasminógeno/plasmina hace necesario añadir una concentración de estreptoquinasa en proporción al plasminógeno mayor que en sistema purificado (alrededor de 20 moles de estreptoquinasa por mol de plasminógeno) para alcanzar la máxima actividad fibrinolítica.

El potencial fibrinolítico de los activadores, tanto estreptoquinasa como uroquinasa, es mucho mayor cuando se encuentran incorporados al coágulo (endógenos) que si se añaden al mismo una vez formado (exógenos). Así, por ejemplo, el tiempo total de formación y lisis de un coágulo de plasma en presencia de 25-30 UI/ml de estreptoquinasa es alrededor de 25 horas, mientras que para conseguir en este tiempo la lisis de un coágulo formado en ausencia de activadores es necesario añadir una concentración de estreptoquinasa superior a 750 UI/ml. Para la estreptoquinasa este efecto no es debido a un incremento de la fibrinogénesis, ya que todo el fibrinógeno se transforma normalmente en fibrina. Sin embargo, para la uroquinasa la

fibrinogenolisis parece ser una función más importante que la fibrinolisis (267).

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene en la fibrinolisis la presencia del activador en el momento de formarse la fibrina. Por una parte, el activador se encuentra uniformemente distribuido en el interior del coágulo, facilitándose así en gran medida su interacción con el plasminógeno. Por otra, la digestión de la fibrina en formación puede proporcionar un mecanismo que controle la formación del trombo y su degradación. En este sentido, Nossel et al. (268-270), basándose en estudios clínicos, han sugerido que el sustrato fisiológico fundamental de la plasmina es la fibrina I, formada al liberarse el fibrinopéptido A por acción de la trombina. El ataque de la plasmina a la fibrina I daría lugar a la formación de polímero X por liberación del péptido B β 1-42, que contiene el fibrinopéptido B. De esta forma, no llega a obtenerse fibrina II, formada al liberarse ambos fibrinopéptidos por acción de la trombina en ausencia de plasmina.

La acción combinada de la trombina y la plasmina puede determinar, por lo tanto, el tipo de fibrina formada, regulando así la unión de plasminógeno a la misma así como su activación. A su vez, la formación de plasmina viene determinada por la presencia de los activadores, de modo que estos ejercen un control global del proceso coagulación-fibrinolisis, tanto más eficaz cuanto más localizada esté la activación del plasminógeno en la fibrina.

Mientras que el t-PA es un activador fibrinoespecífico, la estreptoquinasa y la uroquinasa no están tradicionalmente considerados como tales. Estos dos activadores, sin embargo,

muestran un comportamiento muy diferente en la inducción de la fibrinólisis, tanto exógena como endógena. La activación de plasminógeno por uroquinasa tiene lugar indiscriminadamente, disparando la fibrinogenólisis al mismo tiempo que la fibrinólisis, y sin que la plasmina formada esté protegida de una manera eficaz frente a los inhibidores. La estreptoquinasa, por el contrario, promueve la unión del plasminógeno a la fibrina e impide su interacción con α_2 -antiplasmina. La activación del plasminógeno por la estreptoquinasa tiene lugar mayoritariamente en la superficie de la fibrina, posiblemente con la formación de un complejo ternario similar al descrito para la activación del plasminógeno por t-PA. La plasmina así formada permanece unida a la fibrina hasta la disolución del coágulo, inafectada por el sistema antiplasmina. El mecanismo de acción de la estreptoquinasa es, por lo tanto, similar al del t-PA y, por supuesto, mucho más selectivo que el de la uroquinasa. Por ello, la estreptoquinasa es un activador más efectivo que la uroquinasa, tanto en la inducción de la fibrinólisis exógena como endógena.

IV.2. ESTUDIO DE LA INTERACCION PLASMINOGENO-FIBRINA. IDENTIFICACION DE LOS DOMINIOS DEL FIBRINOGENO/FIBRINA IMPLICADOS.

IV.2.1. Bloqueo selectivo de los dominios D y E del fibrinógeno mediante el empleo de lectinas

La molécula de fibrinógeno contiene 4 cadenas de carbohidrato unidas a las cadenas B β , en los dominios D, y a las cadenas Y, en el dominio E. Las 4 cadenas de carbohidrato son idénticas y contienen 3 restos manosa susceptibles de ser reconocidos por lectinas, como Con A y LcH, con especificidad por D-ma-

nosa y D-glucosa (183). De hecho, ambas lectinas interaccionan específicamente con las cadenas B β y Y del fibrinógeno aisladas por electroforesis en gel de poliacrilamida (237, 271). Sin embargo, el análisis de la unión específica de LcH al fibrinógeno intacto muestra que sólo se unen 2 moles de LcH por mol de fibrinógeno (271), lo que indica que la LcH es capaz de interaccionar únicamente con las cadenas de carbohidrato de uno de los dos dominios, D o E, del fibrinógeno. Del mismo modo, al estudiar la unión de Con A tetramero (pH 7.8) al fibrinógeno se obtiene una relación de dos moles de Con A unidos por mol de fibrinógeno (237). Por el contrario, a pH 5.2 se unen 4 moles de Con A dímero por mol de fibrinógeno (249), lo que demuestra que en este caso la lectina interacciona con las 4 cadenas de carbohidrato en ambos dominios D y E.

De esta forma, es posible bloquear selectivamente uno o ambos dominios del fibrinógeno dependiendo de la lectina utilizada, lo que resulta muy útil para estudiar la interacción plasminógeno-fibrina. Por ello, se ha caracterizado la unión de LcH, Con A y Ac-Con A al fibrinógeno y la fibrina.

El tratamiento de Con A tetramero con anhídrido acético convierte a la proteína en un dímero sin alterar su especificidad de unión a carbohidratos. Este derivado acetilado muestra un comportamiento muy similar al dímero de Con A a pH 5.2 en lo que a su interacción con el fibrinógeno se refiere.

Por una parte, al estudiar la unión de ^{125}I -Ac-Con A al fibrinógeno se obtiene una relación de 4 moles de Ac-Con A unidos por mol de fibrinógeno, con dos clases de sitios de unión ($Kd_1 = 2.4 \mu\text{M}$ y $Kd_2 = 16.6 \mu\text{M}$; $n_1 = n_2 = 2$). Ac-Con A es capaz de unirse, por lo tanto, a las 4 cadenas de carbohidrato, en ambos dominios D y E, aunque con diferente afinidad.

Por otra parte, los complejos Ac-Con A-fibrinógeno obtenidos a una concentración relativa de lectina de 1 mg por mg de fibrinógeno muestran un coeficiente de sedimentación medio de 10.2 S, igual al obtenido para los complejos Con A dímero-fibrinógeno, a pH 5.2, a la misma concentración relativa de lectina (249). A este coeficiente de sedimentación le corresponde un peso molecular de aproximadamente 500 000 Da, teniendo en cuenta que para el fibrinógeno solo (peso molecular 340 000 Da) se obtiene un coeficiente de sedimentación de 7.8 S y considerando que los pesos moleculares son proporcionales a $s^{3/2}$ (272). Este peso molecular, equivalente a 3 moléculas de Ac-Con A unidas por molécula de fibrinógeno, es el valor medio de una mezcla de especies que se mueven en un solo pico asimétrico, por lo que puede decirse que se unen hasta 4 moléculas de Ac-Con A por molécula de fibrinógeno.

En ningún caso se observa la formación de agregados de fibrinógeno por medio de la lectina. El tetramero de Con A, sin embargo, es capaz de formar agregados de fibrinógeno actuando bivalentemente, lo que se demuestra de forma clara por ultracentrifugación analítica (237). Este diferente comportamiento de la lectina nativa y del derivado acetilado está de acuerdo con sus diferentes propiedades de aglutinación (195). Así, a pesar de que ambas moléculas se unen a las células aproximadamente en la misma medida, Ac-Con A no aglutina eritrocitos de oveja a concentraciones de hasta 500 $\mu\text{g/ml}$ mientras que Con A provoca aglutinación a concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$.

El estudio por ultracentrifugación analítica de los complejos LcH-fibrinógeno está de acuerdo con la presencia en la molécula de fibrinógeno de dos sitios de unión para LcH. El coeficiente de sedimentación medio de los complejos que se ob-

tienen a la mayor concentración relativa de lectina estudiada (1 mg/mg fibrinógeno), 8.8 S, es intermedio entre los valores correspondientes a los complejos LcH-fibrinógeno y LcH₂-fibrinógeno (8.5 S y 9.3 S, respectivamente), lo que indica que existe una mezcla de ambos. Tampoco en este caso se observan agregados formados por dos o más moléculas de fibrinógeno unidas entre sí por LcH.

Tanto el fibrinógeno como el fragmento E son retenidos específicamente por Sepharosa-Con A y pueden ser eluidos de la misma por α -MDGP. El fragmento D, por el contrario, no es retenido por la lectina inmovilizada, lo que, en principio, parece indicar que en el fibrinógeno intacto Con A se une a las cadenas de carbohidrato presentes en el dominio E. Sin embargo, por ultracentrifugación analítica se comprueba que tanto el fragmento E como el fragmento D interaccionan con la lectina en solución. Los coeficientes de sedimentación observados demuestran que se une un tetrámero de Con A por cada fragmento D (8.2 S) y hasta 2 tetrámeros por fragmento E (8.7 S), lo que es posible ya que el fragmento E contiene 2 cadenas de carbohidrato.

Estos resultados reflejan una alteración del comportamiento de la lectina como consecuencia de la inmovilización y ponen de manifiesto la cautela con la que se han de interpretar los resultados obtenidos al utilizar la cromatografía de afinidad como método para estudiar una interacción entre macromoléculas.

Mientras que el fibrinógeno es retenido, aunque pobremente, por Sepharosa-LcH, no se detecta retención de ninguno de los dos fragmentos D y E de digestión del fibrinógeno por plasma. Por otra parte, los coeficientes de sedimentación de LcH (3.9 S) y de los fragmentos (D, 4.9 S y E, 2.9 S) se encuentran muy próximos por lo que al estudiar el comportamiento de las

mezclas por ultracentrifugación analítica no se llegan a separar las especies individuales ni siquiera en presencia del inhibidor específico de la interacción. Esto hace más difícil determinar si existe o no interacción en las condiciones normales de experimentación y por ello ha sido necesario comparar el comportamiento de las mezclas en presencia del inhibidor específico (ausencia de complejos) y de un azúcar no inhibidor (posible presencia de complejos en condiciones similares de densidad y viscosidad del disolvente). Los resultados que se obtienen parecen indicar que la LcH interacciona con el fragmento D y no con el fragmento E. Ello se confirma de una forma mucho más concluyente mediante el empleo de un reactivo bifuncional de entrecruzamiento que une covalentemente ¹²⁵I-LcH al fibrinógeno y al fragmento D pero no al fragmento E.

La interacción de la lectina con el fragmento E debiera resultar, en principio, más fácil que con el dominio E en la molécula intacta, al existir menos impedimentos estéricos ya que en el fragmento las cadenas de carbohidrato se encuentran unidas muy próximas al extremo carboxiterminal de las cadenas Y. Sin embargo, no se observa interacción de la LcH con el fragmento E, por lo que es lógico suponer que tampoco se da interacción con el dominio en la molécula intacta. Por otra parte, el análisis del complejo covalente ¹²⁵I-LcH-fibrinógeno digerido por plasmina demuestra claramente la unión de la lectina al dominio D. Asimismo, aparecen en la autorradiografía una serie de bandas no identificadas de carácter inespecífico. No obstante, ya que la lectina sólo se une a 2 de las 4 cadenas de carbohidrato del fibrinógeno y la unión al dominio D es un hecho claro, no se ha estudiado la naturaleza de estas bandas.

El empleo del reactivo bifuncional para determinar cuales son los dominios del fibrinógeno accesibles al tetrámero de Con A muestra que la lectina interacciona con ambos dominios D y E, así como con ambos fragmentos D y E; es decir, presenta 4 sitios de unión por molécula de fibrinógeno. Este resultado obliga a replantear la interpretación de los datos obtenidos anteriormente para la unión de Con A al fibrinógeno (237), que indican que se unen 2 moles de Con A por mol de fibrinógeno. Al estudiar por ultracentrifugación analítica los complejos Con A tetrámero-fibrinógeno se observa un pico con un coeficiente de sedimentación de 13.5 S, que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 750 000-800 000 Da. Este pico puede ser atribuido tanto a un complejo compuesto por 2 moléculas de fibrinógeno unidas entre sí por un tetrámero de Con A (790 000 Da) como a 4 tetrámeros de Con A unidos a una molécula de fibrinógeno (780 000 Da). Por otra parte, ya desde concentraciones relativas de lectina de 200 µg/mg fibrinógeno se observa un pico con un coeficiente de sedimentación de 18-19 S, así como la sedimentación de material, espontáneamente o antes de haberse alcanzado las 60 000 rev/min en la ultracentrífuga, lo que demuestra claramente la formación de agregados de fibrinógeno de alto peso molecular. Cada tetrámero de Con A es, por lo tanto, capaz de unirse a dos cadenas de carbohidrato de moléculas diferentes de fibrinógeno. Teniendo en cuenta los resultados aquí obtenidos se puede concluir que una estequiometría de 2 moles de Con A unidos por mol de fibrinógeno indica realmente que los 4 sitios de la molécula de fibrinógeno se encuentran ocupados por la lectina.

La presencia de 4 sitios de unión para Con A, tanto dímero (pH 5.2) como tetrámero (pH 7.8), en la molécula de fibrinógeno se comprueba al estudiar la unión de ¹²⁵I-Con A a Sepharo sa-fibrinógeno. Existe la posibilidad de que la molécula de fi

brinógeno sufra un cambio conformacional como consecuencia de la inmovilización; de hecho, la LcH no interacciona con el fibrinógeno inmovilizado cuando sí lo hace de una forma clara en solución. Por ello, las constantes de disociación obtenidas no se ha tenido en consideración y este método se ha utilizado únicamente con objeto de comprobar más o menos aproximadamente el número de sitios de unión de la lectina al fibrinógeno.

Ya que la molécula de fibrinógeno es simétrica, los 2 sitios de unión encontrados en un principio para Con A tetrámero debían ser idénticos y presentar ambos, por lo tanto, la misma afinidad. Sin embargo, si se considera que la unión de 2 moles de Con A por mol de fibrinógeno se corresponde realmente con 4 sitios de unión, los datos experimentales anteriormente obtenidos (237) se pueden ajustar mejor a dos clases de sitios de unión ($n_1 = n_2 = 2$, con constantes de disociación aparentes de 0.18 μ M y 2.15 μ M), al igual que ocurriera en el caso de Ac-Con A.

No se ha determinado cuales son las cadenas de carbohidrato más accesibles tanto a Con A como a Ac-Con A. Sin embargo, es razonable suponer que los sitios de unión con menor afinidad se corresponden con las cadenas de carbohidrato unidas a las cadenas γ , en el dominio E, ya que éstas no son accesibles a LcH. Asimismo, se ha demostrado que la neuraminidasa es capaz de liberar el ácido siálico de las 4 cadenas de carbohidrato del fibrinógeno pero el proceso tiene lugar mucho más rápidamente en el oligosacárido unido a las cadenas B β , en el dominio D (273). Las cadenas de carbohidrato presentes en los dominios D de la molécula de fibrinógeno parecen, por lo tanto, más accesibles en general a macromoléculas que las cadenas de carbohidrato presentes en el dominio E.

El hecho de que tanto Con A como Ac-Con A se unan a las

4 cadenas de carbohidrato, en ambos dominios D y E de la molécula de fibrinógeno, mientras que la LcH sólo sea capaz de unirse a las cadenas de carbohidrato presentes en los dominios D depende tanto de los diferentes requerimientos de ambas lectinas en su unión al carbohidrato de glicoproteínas como de la estructura del fibrinógeno.

Ciertas lectinas con similar especificidad hacia monosacáridos pueden diferir en su afinidad por disacáridos, oligosacáridos o glicopéptidos. En este sentido, mientras que la LcH discrimina peor que Con A entre azúcares simples, es, sin embargo, más específica que ésta para glicopéptidos (274). La presencia de la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina es muy importante para la unión de la LcH a glicoproteínas y así, por ejemplo, el oligosacárido de igual estructura que el glicopéptido de la transferrina humana pero carente de la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina es 130 veces menos inhibidor de la hemaglutinación inducida por LcH que el glicopéptido en sí (275).

Los segmentos de las tres cadenas del fibrinógeno que conectan los dominios D y E, α_{50-160} , β_{81-192} y γ_{24-134} , se encuentran totalmente entrelazados en disposición superhelicoidal (15). El uso de anticuerpos específicos frente al péptido γ_{1-78} del fibrinógeno humano ha demostrado que esta secuencia de la cadena γ se encuentra oculta en el interior de esta estructura en la molécula nativa y se expone progresivamente, aunque sólo de una manera parcial, por degradación secuencial de la molécula por plasmina (276). Es por lo tanto bastante probable que la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina₅₂ de la cadena γ en el dominio E se encuentre también en el interior de la región helicoidal, siendo de este modo inaccesible a la LcH.

El fragmento E es una molécula estructuralmente dimérica y comprende los restos α_{17-78} , β_{15-122} y γ_{1-62} (277). La cadena de oligosacárido está, por lo tanto, unida muy próxima al extremo carboxiterminal de las cadenas γ . El hecho de que no se de interacción entre la LcH y el fragmento E sugiere que la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina se encuentra también oculta en el fragmento, al igual que lo está en el correspondiente dominio de la molécula de fibrinógeno, a pesar de la exposición parcial de que es objeto la cadena γ como consecuencia de la digestión por plasmina.

La separación de una cadena de la estructura tricatenaria superhelicoidal que tuviera como resultado la exposición de la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina, requeriría una serie progresiva de cambios conformacionales muy importantes en el dominio E, de los que no hay apenas evidencias físico-químicas (278).

Por otra parte, se ha observado que la destrucción de la arquitectura tridimensional de esta región de la molécula de fibrinógeno tiene como resultado la desaparición del sitio de unión del plasminógeno presente en el fragmento E (221) así como de la expresión de determinantes antigénicos específicos del fragmento E y localizados fundamentalmente en la cadena .

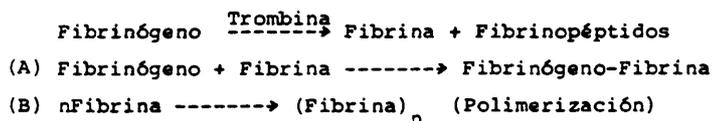
IV.2.2. Influencia de las lectinas en la interacción plasminógeno-fibrina: unión de plasminógeno y fibrinolisis

Las lectinas Con A, Ac-Con A y LcH interaccionan con el fibrinógeno dando lugar a la formación de complejos que se diferencian de la proteína nativa en sus propiedades de coagulación y fibrinolisis. Estos efectos son el resultado de la unión específica de las lectinas a las cadenas de carbohidra-

to del fibrinógeno, ya que no se producen en presencia del azú car específico α -MDGP.

El efecto que ejercen las tres lectinas sobre la velocidad de coagulación del fibrinógeno por trombina es muy similar. Al igual que Con A (237, 249) y LcH (271), Ac-Con A produce una disminución de la velocidad de coagulación a bajas concentraciones mientras que a concentraciones altas la aumenta.

Se ha demostrado que Con A, sin embargo, favorece siempre la agregación de los monómeros de fibrina y además no tiene ningún efecto inhibitor en la liberación de los fibrinopéptidos (249). Por otra parte, ni LcH ni Ac-Con A provocan la formación de agregados de fibrinógeno que pudieran dar lugar a un incremento aparente de la velocidad de coagulación. Ya que el efecto global de las tres lectinas sobre el proceso es el mismo, cabe esperar que en todos los casos se deba a una misma causa y ésta parece ser el apantallamiento de la carga eléctrica del fibrinógeno en las proximidades de las cadenas de carbohidrato, que favorece tanto la atracción entre monómeros de fibrina (B) como la atracción entre moléculas de fibrinógeno y monómeros de fibrina (A):



Dependiendo de la concentración de trombina y según cual de es tos efectos predomine el proceso global de coagulación se verá acelerado ($B > A$) o inhibido ($A > B$).

El hecho de que las tres lectinas estudiadas produzcan el mismo efecto en la velocidad de coagulación pone de manifiesto la importancia de la carga eléctrica total de la molécula de

fibrinógeno, independientemente de su localización en un dominio u otro. Del mismo modo, se ha comprobado que existe una relación lineal entre la cantidad de ácido siálico liberado de la molécula de fibrinógeno por acción de la neuraminidasa y la aceleración de la velocidad de coagulación, a pesar de que la liberación de ácido siálico de las cadenas de carbohidrato en los dominios D es más rápida que en el dominio E (273).

Por otra parte, Con A ejerce el mismo efecto sobre la velocidad de coagulación del asialofibrinógeno que sobre la del fibrinógeno nativo (237), aunque tanto el asialofibrinógeno como sus complejos con Con A coagulan más deprisa que la molécula nativa y sus correspondientes complejos. Las lectinas enmascaran, por lo tanto, no sólo la carga del ácido siálico sino también la carga presente en las proximidades de las cadenas de carbohidrato.

En ningún caso las lectinas producen una disminución del porcentaje de proteína coagulable, ni siquiera a aquellas concentraciones que inhiben la velocidad de coagulación.

Por otra parte, ni Ac-Con A ni LCH tienen ningún efecto sobre el grado de entrecruzamiento de la fibrina formada. La inhibición del tramado observada en presencia de Con A ha de ser, por lo tanto, el resultado de la formación de agregados de fibrinógeno y no una consecuencia de la unión de Con A a un dominio u otro de la molécula. La formación de agregados de fibrinógeno por medio de la lectina puede conducir a un ordenamiento diferente de la red de fibrina que interfiera con el entrecruzamiento de las cadenas α y γ .

Con A y Ac-Con A producen una marcada inhibición de la fibrinolisis mientras que la LCH tiene un efecto claramente menor.

La unión de 1 mol de Con A ó 2 moles de Ac-Con A por mol de fibrinógeno inhibe casi en un 95% la velocidad de lisis de coágulos de fibrina retraídos y lavados; estos niveles de inhibición no se alcanzan, sin embargo, a ninguna concentración de LcH.

Ya que Con A actúa como una molécula bivalente cuando interacciona con el fibrinógeno, cada mol de lectina ocupa realmente dos sitios de unión por mol de fibrinógeno. El efecto de Con A sobre la fibrinólisis en función del número de sitios de hecho ocupados por la lectina debe ser representado, por lo tanto, multiplicando la concentración de Con A unida por un factor de 2. Los datos así corregidos se superponen con los que se obtienen para Ac-Con A (Fig. 29, línea discontinua), de forma que el 95% de inhibición se alcanza cuando 2 sitios de unión en la molécula de fibrinógeno se encuentran ocupados por Con A o Ac-Con A.

El diferente efecto de Con A y LcH sobre la fibrinólisis no es debido, por lo tanto, a la formación de agregados de fibrinógeno ni está relacionado con diferencias en la formación de la fibrina o en el tramado de la misma, ya que Ac-Con A, que no forma agregados de fibrinógeno ni afecta al grado de entrecruzamiento de la fibrina, produce exactamente la misma inhibición de la fibrinólisis que Con A.

Por otra parte, ninguna de las lectinas ejerce un efecto apreciable en la formación del complejo plasminógeno-estreptoquinasa o en la actividad de éste, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en los estudios de fibrinólisis.

La inhibición de la fibrinólisis producida por Con A y Ac-Con A, que no se observa con LcH, sólo puede ser debida, por lo tanto, al bloqueo del dominio E del fibrinógeno por unión de las lectinas. Este bloqueo puede afectar tanto a los sitios de

unión del plasminógeno como a los sitios de ataque de la plasmina.

La fibrina es susceptible al ataque por plasmina básicamente en los mismos sitios y en el mismo orden que el fibrinógeno. Sin embargo, las lectinas no tienen ningún efecto en la fibrinogenolisis ni en la lisis de monómeros de fibrina en solución, por lo que puede decirse que tampoco interferirán con los sitios de ataque de la plasmina en la fibrina.

Por otra parte, ninguna de las lectinas previene la unión del plasminógeno a la fibrina. Este plasminógeno inicialmente unido es además totalmente efectivo en ausencia de lectinas, ya que la eliminación de las lectinas unidas a la fibrina revierte el efecto de inhibición.

Asimismo, Con A produce una inhibición clara de la fibrinólisis exógena, a pesar de la total disponibilidad de plasminógeno en el medio, e incluso de la fibrinólisis endógena, en la que no se da la interacción Glu-plasminógeno-fibrina II en concreto.

Todos estos hechos indican que la inhibición de la velocidad de lisis observada en presencia de Con A y Ac-Con A no es debida a una disminución de la concentración de plasminógeno disponible en el coágulo para la lisis sino que se debe a una falta de efectividad de dicho plasminógeno.

Existe un acuerdo general acerca de la implicación de ambos dominios D y E del fibrinógeno en la unión del plasminógeno (213, 220).

Lehzen et al. (223) han localizado un sitio de unión del plasminógeno en la región termoestable del fragmento D. Esta región está constituida por segmentos de igual tamaño de las tres cadenas polipeptídicas, unidos entre sí por puentes disul

furo (279) y forma parte de la estructura superhelicoidal que conecta los dominios central y terminal de la molécula de fibrinógeno.

Asimismo, Nieuwenhuizen et al. (280) han encontrado que el efecto acelerador de la activación del plasminógeno por t-PA de uno de los fragmentos obtenidos por tratamiento del fibrinógeno con bromuro de cianógeno, el FCB 2, reside en la secuencia $A\alpha_{148-207}$, en la región α -helicoidal del fragmento D.

El sitio de unión del plasminógeno presente en el dominio D parece estar, por lo tanto, bastante alejado de la cadena de carbohidrato unida a la asparagina 364 de la cadena B β en una de las tres estructuras termolábiles que junto con la estructura termoestable constituyen el dominio D del fibrinógeno (Fig. 35) (281).

Por otra parte, Varadi y Patthy (221) han demostrado que la secuencia $Leu_{121}-Lys_{122}$ de la cadena B β , presente en la región conectora superhelicoidal, es esencial para la unión del plasminógeno al fragmento E. De este modo, los sitios de unión del plasminógeno en los fragmentos D y E parecen ser estructuralmente homólogos.

Las cadenas de carbohidrato presentes en el dominio E del fibrinógeno están unidas a la asparagina 52 de ambas cadenas γ , muy próximas a la secuencia $Leu_{121}-Lys_{122}$ de la cadena B β (277). Por lo tanto, la unión de Con A y Ac-Con A al dominio E debe interferir con este sitio de unión del plasminógeno.

El hecho de que la unión de Glu-plasminógeno a la fibrina no se vea afectada por el bloqueo del sitio presente en el dominio E sugiere que el Glu-plasminógeno se une principalmente en el dominio D, lejos del sitio de unión de las lectinas.

Sin embargo, para que la fibrinolisis tenga lugar de una manera efectiva es necesario que el sitio de unión en el domi-

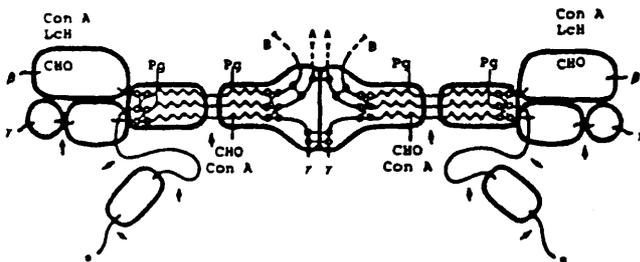


Figura 35. Diagrama de la ordenación de la molécula de fibrinógeno basado en la existencia de regiones con diferente resistencia a la desnaturación térmica (281). Los sitios de ruptura de la molécula en la digestión por plasmina están señalados con flechas. A, fibrinopéptido A; B, fibrinopéptido B; Pg, sitios de unión del plasminógeno; CHO, localización aproximada del carbohidrato; Con A, sitios de unión de Con A y LcH, sitios de unión de LcH.

nio E se encuentre accesible, permitiendo la interacción con el plasminógeno. Esta interacción, que probablemente requiera alguna transformación proteolítica del plasminógeno o de la fibrina o incluso de ambos, se ve impedida por la unión de Con A o Ac-Con A a las cadenas de carbohidrato del dominio E, muy próximas al sitio de unión del plasminógeno, y ello tiene como resultado la inhibición de la fibrinólisis.

Basándose en estudios sobre la interacción del plasminógeno con los fragmentos D y E, Lucas et al. (213) han propuesto un modelo según el cual el Glu-plasminógeno se uniría al dominio D, viéndose con ello favorecida su activación a plasmina, mientras que el Lys-plasminógeno, formado a partir del Glu-plasminógeno precisamente por acción de esta plasmina inicial, se uniría al dominio E, localizando así la actividad proteolítica en la fibrina.

La unión de Con A a las cadenas de carbohidrato del dominio E no previene, sin embargo, la unión del Lys-plasminógeno a la fibrina, si bien produce una clara inhibición de la fibrinólisis. Este hecho sugiere que el paso de Glu-plasminógeno a Lys-plasminógeno no es la transformación proteolítica necesaria o al menos suficiente para que tenga lugar la interacción en el dominio E, ya que el Lys-plasminógeno parece unirse también principalmente a los sitios de unión presentes en el dominio D.

Aunque la interacción del Lys-plasminógeno con el fragmento E ha sido suficientemente probada (213, 220), ello no refleja necesariamente que el Lys-plasminógeno se una al dominio E en la molécula intacta ya que es posible que los sitios de unión se encuentren presentes pero escondidos en el fibrinógeno /fibrina y no sean totalmente funcionales. La disección proteo-

lítica de la molécula puede eliminar los péptidos que enmasca ren estos sitios y ponerlos al descubierto. De hecho, Varady y Patthy (220) han comprobado que mientras los fragmentos D y E son retenidos por Sepharosa-Lys-plasminógeno, no ocurre lo mismo con el fibrinógeno intacto.

Teniendo en cuenta los grandes cambios estructurales que tienen lugar en la región carboxiterminal de la cadena γ , en el dominio D, como consecuencia de la polimerización, parece posible que los sitios de unión del plasminógeno en este dominio se expongan en el proceso de coagulación. Sin embargo, la exposición de los sitios de unión en el dominio E de la fibrina probablemente requiera el ataque proteolítico de la plasmina. La interacción del plasminógeno/plasmina con la fibrina en estos sitios tendría lugar, por lo tanto, una vez iniciado el proceso fibrinolítico, ya en presencia de los activadores.

IV.3. MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA PLASMINOGENO-PLASMINA EN LA FIBRINOLISIS

Considerando en conjunto todos los resultados anteriormente expuestos es posible formular un modelo sobre el mecanismo de acción del sistema plasminógeno-plasmina en la fibrinólisis.

Los cambios conformacionales que tienen lugar en el dominio D de la fibrina como consecuencia de la polimerización conducen a la aparición en este dominio de un sitio de unión para el plasminógeno. La interacción del plasminógeno con la fibrina en este sitio hace que su activación a plasmina se vea favorecida.

En presencia de los activadores la unión de plasminógeno (tanto Glu- como Lys-plasminógeno) a la fibrina en formación tiene lugar en asociación con la formación de plasmina. La modificación proteolítica, por acción de esta plasmina, de la fibrina en formación proporciona, por una parte, un mecanismo que regula el tipo de fibrina formada y, por otra parte, conduce a la exposición en el dominio E de la fibrina de nuevos sitios de unión para el plasminógeno. La interacción del plasminógeno/plasmina en estos sitios es fundamental para que la fibrinólisis tenga lugar de una manera eficaz, de forma que el bloqueo de los sitios de unión en el dominio E provoca una inhibición prácticamente total de la fibrinólisis.

-153-

v. CONCLUSIONES

1.- La velocidad de lisis de coágulos retraídos y lavados viene determinada por la concentración de plasminógeno unido a la fibrina y por la capacidad del activador para difundir al interior del coágulo. En presencia de los activadores el plasminógeno circulante puede unirse a la fibrina , de forma que la fibrinólisis exógena de coágulos intactos es mucho más efectiva que la lisis de coágulos retraídos.

2.- El potencial fibrinolítico de los activadores es mucho mayor cuando estos se encuentran presentes en el momento de formarse la fibrina que si se añaden a los coágulos una vez formados. La presencia de los activadores durante el proceso de coagulación puede proporcionar un mecanismo que regule el tipo de fibrina formada y su degradación.

3.- El mecanismo de acción de la estreptoquinasa es similar al del t-PA y mucho más selectivo que el de la uroquinasa. Ello hace que la estreptoquinasa sea más efectiva que la uroquinasa en la inducción de la fibrinólisis tanto exógena como endógena.

4.- Tanto Con A como su derivado acetilado se unen a las 4 cadenas de carbohidrato del fibrinógeno, aunque con distinta afinidad en un dominio y otro, mientras que la LcH sólo se une a las cadenas de carbohidrato presentes en los dominios D.

5.- El hecho de que la LcH no sea capaz de interaccionar

con las cadenas de carbohidrato presentes en el dominio E o en el fragmento E indica que la secuencia N-acetil-glucosamina-asparagina, necesaria para la unión de LcH a glicoproteínas, se encuentra en el interior de la estructura helicoidal que conecta los dominios D y E del fibrinógeno y que esta estructura se conserva en el fragmento E.

6.- Al igual que Con A y LcH, Ac-Con A produce una inhibición de la velocidad de coagulación a bajas concentraciones mientras que a concentraciones altas la aumenta. Este efecto es debido a un apantallamiento de la carga eléctrica del fibrinógeno en las proximidades de las cadenas de carbohidrato, independientemente de su localización en un dominio u otro, que favorece tanto la atracción entre monómeros de fibrina (aceleración) como la atracción entre fibrinógeno y monómeros de fibrina (inhibición).

7.- Ya que Ac-Con A y LcH, que no provocan la formación de agregados de fibrinógeno, no tienen ningún efecto sobre el grado de entrecruzamiento de la fibrina, la inhibición del tramado producida por Con A ha de ser debida a la formación de agregados de fibrinógeno, que puede conducir a un ordenamiento diferente de la red de fibrina, y no a la unión a uno u otro dominio.

8.- Con A y Ac-Con A producen una marcada inhibición de la fibrinólisis mientras que LcH tiene un efecto claramente menor.

Sin embargo, ninguna de las lectinas estudiadas tiene efecto en la fibrinogenolisis ni en la digestión de monómeros de fibrina en solución, lo que indica que no interfieren con los sitios de ataque de la plasmina en la molécula de fibrinógeno /fibrina. Por lo tanto, la inhibición de la fibrinólisis producida por Con A y Ac-Con A es debida a la unión de dichas lectinas a las cadenas de carbohidrato presentes en el dominio E.

9.- El hecho de que la unión del plasminógeno a la fibrina no se vea afectada por ninguna de las lectinas sugiere que el plasminógeno, tanto Glu- como Lys-, se une principalmente a sus sitios en el dominio D, bastante alejados de las cadenas de carbohidrato. Los sitios de unión del plasminógeno presentes en el fragmento E deben de estar ocultos en el fibrinógeno /fibrina y exponerse como consecuencia del ataque proteolítico de la plasmina. La interacción del plasminógeno/plasmina en es tos sitios, una vez iniciado el proceso fibrinolítico, es fundamental para que la fibrinólisis tenga lugar de una manera eficaz. La unión de Con A y Ac-Con A a las cadenas de carbohidrato del fibrinógeno en el dominio E, muy próximas al sitio de unión del plasminógeno, impide esta interacción y ello produce una inhibición de la fibrinólisis.

-157-

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- HENSCHEN, A. (1964)
Arkiv. Kemi. 22 355-373
- 2.- LOTTSPREICH, F.; HENSCHEN, A. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 935-938
- 3.- HENSCHEN, A; LOTTSPREICH, F. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 1643-1646
- 4.- HENSCHEN, A; F. LOTTSPREICH; B. HESSEL (1979)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 1951-1956
- 5.- DOOLITTLE, R.F.; WATT, K.W.K.; COTTRELL, B.A.; STRONG,
D.D.; RILEY, M. (1979)
Nature 280 464-468
- 6.- HENSCHEN, A; LOTTSPREICH, F; TÖPFER-PETERSEN, E; KEHL, M.;
TIMPL, R. (1980)
Protides Biol. Fluids 28 47-50
- 7.- BLOMBÄCK, B.; GRÖNDAHL, N.J.; HESSEL, B.; IWANAGA, S.;
WALLEN, P. (1973)
J. Biol. Chem. 248 5806-5820
- 8.- TOWNSEND, R.R.; HILLIKER, E.; LI, Y-T.; LAINE, R.A.; BELL, W.R. (1982)
J. Biol. Chem. 257 9704-9710
- 9.- BLOMBÄCK, B; BLOMBÄCK, M; HENSCHEN, A.; HESSEL, B;
IWANAGA, S.; WOODS, K.R. (1968)
Nature 218 130-134
- 10.- BLOMBÄCK, B; HESSEL, B.; HOGG, D. (1976)
Thromb. Res. 8 639-658
- 11.- HOEPRICH, P.D.; DOOLITTLE, R.F. (1983)
Biochemistry 22 2049-2055

- 12.- GÄRDLUND, B; HESSEL, B.; MARGUERIE, G; MURANO, G.;
BLOMBÄCK, B (1977)
Eur. J. Biochem. 77 595-610
- 13.- HENSCHEN, A. (1978)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 1757-1770
- 14.- HENSCHEN, A; LOTTSPREICH, F; HESSEL, B. (1978)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 1607-1610
- 15.- DOOLITTLE, R.F.; GOLDBAUM, D.M.; DOOLITTLE, L.R. (1978)
J. Mol. Biol. 120 311-325
- 16.- DOOLITTLE, R.F. (1973)
Adv. Protein Chem. 27 1-109
- 17.- HALL, C.E.; SLAYTER, H.S. (1959)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5 11-15
- 18.- TOONEY, N.M.; COHEN, C. (1972)
Nature 237 23-25
- 19.- COHEN, C.; TOONEY, N.M. (1974)
Nature 251 659-660
- 20.- TOONEY, N.M.; COHEN, C. (1977)
J. Molec. Biol. 110 363-385
- 21.- WEISEL, J.W.; PHILLIPS, G.N.; COHEN, C. (1981)
Nature 289 263-267
- 22.- WEISEL, J.W.; STAUFFACHER, C.V.; BULLITT, E.; COHEN, C.
(1985)
Science 230 1388-1391
- 23.- ERICKSON, H.P.; FOWLER, W.E. (1983)
Ann. New. York Acad. Sci. 408 146-163

- 24.- MARDER, V.J.; SHULMAN, N.R.; CARROLL, W.R. (1969)
J. Biol. Chem. 244 2111-2119
- 25.- PIZZO, S.V.; SCHWARTZ, M.L.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A. (1972)
J. Biol. Chem. 247 636-645
- 26.- FERGUSON, E.W.; FRETTO, L.J.; MCKEE, P.A. (1975)
J. Biol. Chem. 250 7210-7218
- 27.- BUDZYNSKI, A.Z.; MARDER, V.J.; SHAINOFF, J.R. (1974)
J. Biol. Chem. 249 2294-2302
- 28.- KOEHN, J.A.; HURLET-JENSEN, A.; NOSSEL, H.L; CANFIELD,
R.E. (1983)
Anal. Biochem. 133 502-510
- 29.- KOWALSKA-LOTH, B.; GARDLUND, B.; EGBERG, N.; BLOMBACK, B. (1973)
Thromb. Res. 2 423-450
- 30.- TAKAGI, T.; DOOLITTLE, R.F. (1975)
Biochemistry 14 940-946
- 31.- HAVERKATE, F.; TIMAN, G.; NIEUWENHUIZEN, W. (1979)
Eur. J. Clin. Invest. 9 253-255
- 32.- NIEUWENHUIZEN, W.; VERMOND, A.; NOOIJEN, W.J.;
HAVERKATE, F. (1979)
FEBS Letters 98 257-259
- 33.- KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S.; HAWIGER, J. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 107 181-187
- 34.- HAVERKATE, F.; TIMAN, G. (1977)
Thromb. Res. 10 803-812
- 35.- FOWLER, W.E.; FRETTO, L.J.; ERICKSON, H.D.;
MCKEE, P.A. (1980)

- J. Clin. Invest. 66 50-56
- 36.- PLOW, E.F.; EDGINGTON, T.S. (1973)
J. Clin. Invest. 52 273-282
- 37.- PLOW, E.F.; EDGINGTON, T.S. (1975)
J. Biol. Chem. 250 3386-3392
- 38.- STRAUB, W.; DUCKERT, F. (1961)
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 5 402-425
- 39.- NEMERSON, Y. (1966)
Biochemistry 5 601-608
- 40.- ØSTERUD, B.; RAPAPORT, S.I (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 5260-5264
- 41.- NEMERSON, Y.; ZUR, M.; BACH, R.; GENTRY, R.D. (1980)
En "The Regulation of Coagulation" pp. 193-203
Mann, R.G. Taylor F.B. eds. New York. Elsevier/ North-
Holland
- 42.- MORRISON, S.A.; JESTY, J. (1984)
Blood 63 1338-1347
- 43.- BAJAJ, S.P.; RAPAPORT, S.I.; BROWN, S.F. (1981)
J. Biol. Chem. 256 253-259
- 44.- SELIGSOHN, U.; ØSTERUD, B.; BROWN, S.F.; GRIFFIN, J.H.;
RAPAPORT, S.I. (1979)
J. Clin. Invest. 64 1056-1065
- 45.- GRIFFIN, J.H. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 1998-2002
- 46.- REVAK, S.D.; COCHRANE, C.G.; BOUMA, B.N.; GRIFFIN, J.H.
(1978)

- J. Exp. Medicine 147 719-729
- 47.- COLMAN, R.W. (1984)
J. Clin. Invest. 73 1249-1253
- 48.- WALSH, P.N.; GRIFFIN, J.H. (1981)
Blood 57 106-118
- 49.- WALSH, P.N.; TUSZYNSKI, G.P.; GREENGARD, J.S.;
GRIFFIN, J.H. (1984)
Haematologia 17 1269-1278
- 50.- GREENGARD, J.S.; GRIFFIN, J.H. (1984)
Biochemistry 23 6863-6869
- 51.- SCHMAIER, A.H.; ZUCKERBERG, A.; SILVERMAN, C. (1983)
J. Clin. Invest. 71 1477-1489
- 52.- MACFARLANE, R.G.; BIGGS, R.; ASH, B.J.; DENSON, K.W.E.
(1964)
British J. Haematol. 10 530-541
- 53.- VAN DIEIJEN, G.; TANS, G.; ROSING, J.; HEMKER, H.C.
(1981)
J. Biol. Chem. 256 3433-3442
- 54.- SILVERBERG, S.A.; NEMERSON, Y.; ZUR, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252 8481-8488
- 55.- ESMON, C.T.; OWEN, W.G.; JACKSON, C.M. (1974)
J. Biol. Chem. 249 8045-8047
- 56.- TRACY, P.B.; NESHEIM, M.E.; MANN, K.G. (1981)
J. Biol. Chem. 256 743-751
- 57.- BLOMBÄCK, B.; BLOMBÄCK, M. (1972)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 202 77-97

- 58.- HOGG, D.H.; BLOMBACK, B. (1978)
Thromb. Res. 12 953-964
- 59.- BLOMBACK, B.; HESSEL, B.; HOGG, D.; THERKILDSEN, L.
(1978)
Nature 275 501-505
- 60.- OLEXA, S.A.; BUDZYNSKI, A.Z. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 1374-1378
- 61.- LAUDANO, A.P.; DOOLITTLE, R.F. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 3085-3089
- 62.- DOOLITTLE, R.F. (1981)
En "Haemostasis and Thrombosis" 163-191
Bloom, A.L.; Thomas, D.P. eds . Edinburgh: Churchill Livingstone
- 63.- FOWLER, W.E.; ERICKSON, H.P.; HANTGAN, R.R.;
McDONAGH, J.; HERMANS, J. (1981)
Science 211 287-289
- 64.- HANTGAN, R.R.; HERMANS, J. (1979)
J. Biol. Chem. 254 11272-11281
- 65.- FOWLER, W.E.; HANTGAN, R.R.; HERMANS, J.; ERICKSON,
H.P. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 4872-4876
- 66.- ROSSER, W.R.; ROBERTS, W.W.; FERRY, J.D. (1977)
Biophys. Chem. 7 153-157
- 67.- SHEN, L.L.; HERMANS, J.; McDONAGH, J.; McDONAGH, R.P.;
CARR, M (1975)
Thromb. Res. 6 255-265

- 68.- LORAND, L.; LOSOWSKY, M.S.; MILOSZEWSKI (1980)
En "Progress in Hemostasis and Thrombosis"
T.H. Spaet, ed. 5 245-290 Grune and Stratton. New
York
- 69.- CURTIS, C.G.; BROWN, K.L.; CREDO, R.B.; DOMANIK, R.A.;
GRAY, A.; STENBERG, P.; LORAND, L. (1974)
Biochemistry 13 3774-3780
- 70.- LORAND, L.; STENBERG, P. (1976)
En "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology"
Proteins, Vol II pág 669, Fasman, G. ed. Cleveland,
Ohio: CRC Press
- 71.- CHEN, R.; DOOLITTLE, R.F.; (1971)
Biochemistry 10 4486-4491
- 72.- KANAIDE, H.; SHAINOFF, J.R. (1975)
J. Lab. Clin. Med. 85 574-597
- 73.- MOSESSON, M.W. HAINFELD, J.; HASCHEMEYER, R.H.;
WALL, J. (1981)
J. Mol. Biol. 153 695-718
- 74.- COTTRELL, B.A.; STRONG, D.D.; WATT, K.W.K.; DOOLITTLE,
R.F. (1979)
Biochemistry 18 5405-5410
- 75.- FRETTO, L.J.; FERGUSON, E.W.; STEINMAN, H.M.; MCKEE, P.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253 2184-2195
- 76.- IWANAGA, S.; SUZUKI, K.; HASHIMOTO, S. (1978)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 312 56-73

- 77.- PIZZO, S.W.; TAYLOR, L.M.; SCHWARTZ, M.L.; HILL, R.L.;
McKEE, P.A.
J. Biol. Chem. 248 4584-4590
- 78.- GAFFNEY, P.J.; LANE, D.A.; KAKKAR, V.V.; BRASHER, M.
(1975)
Thromb. Res. 7 89-99
- 79.- FRANCIS, C.W.; MARDER, V.J. (1982)
Sem. Thromb. Hemost. 8 25-35
- 80.- FRANCIS, C.W.; MARDER, V.J.; BARLOW, G.H. (1980)
J. Clin. Invest. 66 1033-1043
- 81.- SOTTRUP-JENSEN, L.; CLAEYS, H.; ZAJDEL, M.; PETERSEN,
T.E.; MAGNUSSON, S. (1978)
"Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis"
Davidson, J.F.; Rowan, R.M.; Samama, M.M.; Desnoyers,
P.C. eds. Vol. 3 191-209
- 82.- HAYES, M.L.; CASTELLINO, F.J. (1979)
J. Biol. Chem. 254 8768-8771
- 83.- " 8772-8776
- 84.- " 8777-8780
- 85.- WALLEN, P.; WIMAN, B. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 257 122-134
- 86.- COLLEN, D. (1980)
Thromb. Haemostas. 43 77-89
- 87.- SJOHOLM, I.; WIMAN, B.; WALLEN, P. (1973)
Eur. J. Biochem. 39 471-479

- 88.- VIOLAND, B.N.; BYRNE, R.; CASTELLINO, F.J. (1978)
J. Biol. Chem. 253 5395-5401
- 89.- MARKUS, G.; PRIORE, R.L.; WISSLER, F.C. (1979)
J. Biol. Chem. 254 1211-1216
- 90.- MARKUS, G.; EVERS, J.L.; HOBIRA, G.H. (1978)
J. Biol. Chem. 253 733-739
- 91.- CHRISTENSEN, U. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 481 638-647
- 92.- PELTZ, S.W.; HARDT, T.A.; MANGEL, W.F. (1982)
Biochemistry 21 2798-2804
- 93.- THORSEN, S. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 393 55-65
- 94.- POWELL, J.R.; CASTELLINO, F.J. (1980)
J. Biol. Chem. 255 5329-5335
- 95.- ABIKO, Y; IWAMOTO, M.; TOMIKAWA, M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 185 442-431
- 96.- BROCKWAY, W.J.; CASTELLINO, F.J. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 151 494-499
- 97.- LERCH, P.G.; RICKLI, E.E.; LERGIER, W.; GILLESSEN, D.
(1980)
Eur. J. Biochem. 107 7-13
- 98.- LUCAS, M.A.; FRETTO, L.J.; MCKEE, R.A. (1983)
J. Biol. Chem. 258 4249-4256
- 99.- VALI, Z.; PATTHY, L. (1984)
J. Biol. Chem. 259 13690-13694

- 100.- ICHINOSE, A.; MIMURO, J.; KOIDE, T.; AOKI, N.
(1984)
Thromb.Res. 33 401-407
- 101.- DEUTSCH, D.G.; MERTZ, E.T. (1970)
Science 170 1095-1096
- 102.- ROBBINS, K.C.; SUMMARIA, L.; HSIEH, B.; SHAH, R.J.
(1967)
J. Biol. Chem. 242 2333-2342
- 103.- VIOLAND, B.N.; CASTELLINO, F.J. (1976)
J. Biol. Chem. 251 3906-3912
- 104.- SUMMARIA, L.; ARZADON, L.; BERNABE, P.; ROBBINS, K.C.
(1975)
J. Biol. Chem. 250 3988-3995
- 105.- SIEFRING, G.E.; CASTELLINO, F.J. (1975)
J. Appl. Physiol. 38 114
- 106.- GROSKOPF, W.R.; SUMMARIA, L.; ROBBINS, K.C. (1969)
J. Biol. Chem. 244 3590
- 107.- ROBBINS, K.C.; BERNABE, P.; ARZADON, L.; SUMMARIA, L.
(1973)
J. Biol. Chem. 248 1631
- 108.- RATNOFF, O.D.; NAFF, G.B. (1967)
J. Exp. Med. 125 337
- 109.- WARD, P.A. (1967)
J. Exp. Med. 126 189
- 110.- ARROYAVE, C.M.; MULLER-EBERHARD, H.J. (1973)
J. Immunol. 111 536

- 111.- HARPEL, P.C. (1970)
J. Clin. Invest. 49 58
- 112.- KAPLAN, A.P.; AUSTEN, K.F. (1971)
J. Exp. Med. 133 696
- 113.- ALLAGILE, D.; SOULIER, J.P. (1956)
Semaine Hop. Paris 32 355
- 114.- MIRSKY, J.A.; PERISUTTI, G.; DAVIS, N.C. (1959)
J. Clin. Invest. 38 14
- 115.- JANEWAY, C.A.; MERLER, E.; ROGEN, F.S.; SALMON, S.; (1967)
New Engl. J. Med. 278 919
- 116.- WALLEN, P.; IWANAGA, S. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 258 577
- 117.- WEINSTEIN, M.J.; DOOLITTLE, R.F. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 334 187
- 118.- CHRISTENSEN, U.; MULLERTZ, S. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 480 275-281
- 119.- HOLEMANS, R.; ROBERTS, H.R. (1964)
J. Lab. Clin. Med. 64 778
- 120.- IATRIDES, S.G.; FERGUSON, J.H.; (1962)
J. Clin. Invest. 41 1277
- 121.- NIEWIAROWSKI, S.; PROU-WARTELLE, O. (1959)
Thromb. Diath. Hemorrh. 3 593
- 122.- WEISS, A.S.; GALLIN, J.I.; KAPLAN, A.P. (1974)
J. Clin. Invest. 53 622
- 123.- SAITO, H.; RATNOFF, O.D.; WALDMANN, R.; ABRAHAM, J.P.
(1975)

- J. Clin. Invest. 55 1082
- 124.- COLMAN, R.W. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 273
- 125.- KAPLAN, A.P.; AUSTEN, K.F. (1972)
J. Exp. Med. 136 1378
- 126.- PLOUG, J.; KJELDGAARD (1957)
Biochem. Biophys. Acta 24 278
- 127.- WHITE, W.F.; BARLOW, G.H.; MOZEN, M.M. (1966)
Biochemistry 5 2160-2169
- 128.- BOOYSE, F.M.; OSIKOWICZ, G.; FEDER, S.; SHEINBUKS, J.
(1984)
J. Biol. Chem. 259 7198
- 129.- WUN, T.C.; SCHLEUNING, W.D.; REICH, E. (1982)
J. Biol. Chem. 257 3276
- 130.- GÜNZLER, W.A.; STEFFENS, G.J.; OTTING, F.; BUSE, G.;
FLOHE, L. (1982)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363 133-141
- 131.- BERNIK, M.B. (1973)
J. Clin. Invest. 52 823-834
- 132.- NIELSEN, L.S.; HANSEN, J.G.; SKRIVER, L.; WILSON, E.L.;
KALTOFT, K.; ZEUTHEN, J.; DANØ, K. (1982)
Biochemistry 21 6410-6415
- 133.- HUSAIN, S.; GUREWICH, V.; LIPINSKI, B. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 220 31-38
- 134.- ZAMARRON, C.; LIJNEN, H.R.; VAN HOEF, B.; COLLEN, D.
(1984)

- Thromb. Haemost. 52 19-23
- 135.- GUREWICH, V.; PANNELL, R.; LOVIE, S.; KELLEY, P.;
SUDDITH, R.L.; GREENLEE, R. (1984).
J. Clin. Invest. 73 1731-1739
- 136.- LIJNEN, H.R.; ZAMARRON, C.; COLLEN, D. (1985)
Eur. J. Biochem. 150 141-144
- 137.- LESUK, A.; TERMINIELLO, L.; TRAVER, J.H. (1965)
Science (Wash. DC) 147 880-882
- 138.- SOBERANO, M.E.; ONG, E.B.; JOHNSON, A.J.; LEVY, M. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 445 763-773
- 139.- BURGESS, R.A.; BRAMMER, K.W.; COOMBES, J.D. (1965)
Nature (London) 208 894
- 140.- OGAWA, N.; YAMAMOTO, H.; KATAMINE, T.; TAJIMA, H.
(1975)
Thromb. Diath. Haemorrh. 34 194-209
- 141.- VUKOVICH, T.; BINDER, B.; AUERSWALD, W. (1975)
Thromb. Diath. Haemorrh. 34 338
- 142.- HUBER, K.; BINDER, B.R. (1980)
Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. 28 409-412
- 143.- SUMI, H.; ROBBINS, R.C. (1981)
En "Progress in Fibrinolysis" Davidson, J.F.;
Nilsson, I.M.; Asted, B. eds. Vol 5 pp 36-37
Churchill Livingstone, Edinburgh
- 144.- KOHNO, T.; HOPPER, P.; LILLQUIST, J.S.; SUDDITH, R.L.;
GREENLEE, R.; MOIR, D.T. (1984)
Bio/Technology 2 628-634

- 145.- THORSEN, S.; MULLERTZ, S. (1974)
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 34 167
- 146.- CLAEYS, H.; VERMYLEN, J. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 342 351
- 147.- RIJKEN, D.C.; WIJNGAARDS, G.; ZAAL-DE JONG, M.;
WELBERGEN, J. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 580 140-153
- 148.- ASTRUP, T. (1966)
Fed. Proceed. 25 42-51
- 149.- RIJKEN, D.C.; COLLEN, D. (1981)
J. Biol. Chem. 256 7035-7041
- 150.- PENNICA, D.; HOLMES, W.E.; KOHR, W.J.; HARKINS, R.N.;
VEHAR, G.A.; WARD, C.A.; BENNETT, W.F.; YELVERTON, E;
SEEBURG, P.H.; HYNEKER, H.L.; GOEDEL, D.V.; COLLEN, D.
(1985)
Nature 301 214-221
- 151.- COLLEN, D.; STASSEN, J.M.; MARAFINO, B.; BUILDER, S.;
DE COCK, F.
(1984)
J. Pharm. Exp. Therap. 231 146-152
- 152.- WALLEN, P.; POHL, G.; BERGSDORF, N.; RANBY, M; NY, T.;
JÖRNVALL, H. (1983)
Eur. J. Biochem. 132 681-686
- 153.- BANYAI, L.; VARADI, A.; PATTY, L. (1983)
FEBS Letters 163 37-41
- 154.- RIJKEN, D.C.; HOYLATERS, M.; COLLEN, D. (1982)
J. Biol. Chem. 257 2920-2925

- 155.- HOYLATERS, M.; RIJKEN, D.C.; LIJNEN, H.R. COLLEN, D.
(1982)
J. Biol. Chem. 257 2912-2919
- 156.- MCKEE, P.A.; LEMMON, W.B.; HAMPTON, J.W. (1971)
Thromb. Diath. Haemorrh. 26 512
- 157.- WULF, R.J.; MERTZ, E.T. (1969)
Can. J. Biochem. 47 927-931
- 158.- MILSTONE, H. (1941)
J. Immunol. 42 109-116
- 159.- TAYLOR, F.B.; BOTTS, J. (1968)
Biochemistry 7 232-242
- 160.- BROCKWAY, W.J.; CASTELLINO, F.J. (1974)
Biochemistry 13 2063-2070
- 161.- CASTELLINO, F.J. (1981)
Chem. Rev. 81 431-446
- 162.- SCHICK, L.A.; CASTELLINO, F.J. (1973)
Biochemistry 12 4315-4321
- 163.- MOROI, M.; AOKI, N. (1976)
J. Biol. Chem. 251 5956-5965
- 164.- WIMAN, B.; COLLEN, D. (1977)
Eur. J. Biochem. 78 19-26
- 165.- MÜLLERTZ, S.; CLEMMENSEN, I. (1976)
Biochem. J. 159 545-553
- 166.- CHRISTENSEN, U.; CLEMMENSEN, I. (1977)
Biochem. J. 163 389-391

- 167.- WIMAN, B.; COLLEN, D. (1978)
Eur. J. Biochem. 84 573-578
- 168.- WIMAN, B.; BOMAN, L.; COLLEN, D. (1978)
Eur. J. Biochem. 87 143-146
- 169.- WIMAN, B.; COLLEN, D. (1979)
J. Biol. Chem. 254 9291-9297
- 170.- WIMAN, B.; LINJEN, H.R.; COLLEN, D. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 579 142
- 171.- ALKJAERSIG, N.; FLETCHER, A.P.; SHERRY, S. (1959)
J. Clin. Invest. 38 1086-1095
- 172.- AMBRUS, C.M.; MARKUS, G. (1960)
Amer. J. Physiol. 199 491-494
- 173.- CHESTERMAN, C.N.; ALLINGTON, M.J.; SHARP, A.A. (1972)
Nature 238 15-17
- 174.- WIMAN, B.; COLLEN, D. (1978)
Nature 272 549-550
- 175.- RAKOCZI, I.; WIMAN, B.; COLLEN, D. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 540 295-300
- 176.- WIMAN, B.; WALLEN, P. (1975)
Eur. J. Biochem. 50 489-494
- 177.- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. (1936)
J. Bacteriol. 32 227-237
- 178.- BOYD, W.C.; REGUERA, R.M. (1949)
J. Immunol. 62 333-339
- 179.- WATKINS, W.M.; MORGAN, T.J. (1952)
Nature 169 825-826

- 180.- LIS, H.; SHARON, N. (1977)
En "The Antigens" Sela, M. ed. Vol 4 pp 429-529
Academic Press, New York
- 181.- NICOLSON, G.L. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 457 57-108
- 182.- NICOLSON, G.L. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 458 1-72
- 183.- GOLDSTEIN, I.J.; HAYES, C.E. (1978)
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35 127-340
- 184.- LIS, H.; SHARON, N. (1984)
En "Biology of Carbohydrates". Ginsburg, V.;
Robbins, P.W. ed. Vol 2, pp. 1-85 John Wiley &
Sons, New York
- 185.- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. (1935)
J. Immunol. 29 133-134
- 186.- INBAR, M.; SACHS, L. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 1418-1425
- 187.- GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E.; SMITH, E.E. (1965)
Biochemistry 4 876-883
- 188.- PORETZ, R.D.; GOLDSTEIN, P.J. (1970)
Biochemistry 9 2890-2896
- 189.- GOLDSTEIN, I.J.; REICHERT, C.M.; MISAKI, A (1974)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 234 283-296
- 190.- POWELL, A.E.; LEON, M.A. (1970)
Exp. Cell Res. 62 315-325

- 191.- BECKERT, W.H.; SHARKEY, M.M. (1970)
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 39 337-341
- 192.- YAHARA, I.; EDELMAN, G.M. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 608-612
- 193.- YAHARA, I.; EDELMAN, G.M. (1973)
Exp. Cell Res. 81 143-145
- 194.- KALB, A.J.; LUSTIG, A. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 168 366-367
- 195.- GUNTHER, G.R.; WANG, J.L.; YAHARA, I. CUNNINGHAM, B.A.;
EDELMAN, G.M. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 1012-1016
- 196.- PFLUMM, M.N.; BEYCHOK, S. (1974)
Biochemistry 13 4982-4986
- 197.- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N.; BECKER, J.
W.; WAXDAL, M.J.; WANG, J.L. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 2580-2584
- 198.- OLSON, M.O.J.; LIENER, I.E. (1967)
Biochemistry 6 105-111
- 199.- WANG, J.L.; EDELMAN, G.M. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 1130-1134
- 200.- BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; WANG, J.L.; CUNNINGHAM, B.A.;
EDELMAN, G.M. (1975)
J. Biol. Chem. 250 1513-1524
- 201.- KALB, A.J.; LEVITZKI, A. (1968)
Biochem. J. 109 669-672
- 202.- SHOHAM, M.; KALB, A.J.; PECHT, I. (1973)
Biochemistry 12 1914-1917
- 203.- AGRAWAL, B.B.L.; GOLDSTEIN, I.J. (1968)
Can. J. Biochem. 46 1147-1150

- 204.- BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; CUNNINGHAM, B.A.;
EDELMAN, G.M. (1976)
Nature 259 406-409
- 205.- TICHY, M.; TICHA, M.; KOCOUREK, J. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 229 63-67
- 206.- PAULOVA, M.; TICHA, M.; ENTLICHER, G.; KOSTIR, J.V.;
KOCOUREK, J. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 252 388-395
- 207.- HOWARD, I.K.; SAGE, H.J.; STEIN, M.D.; YOUNG, N.M.;
LEON, M.A.; DYCKES, D.F. (1971)
J. Biol. Chem. 246 1590-1595
- 208.- FLIEGEROVA, O.; SALVETOVA, A.; TICHA, M.; KOCOUREK, J.
(1974)
Biochim. Biophys. Acta 351 416-426
- 209.- STEIN, M.D.; HOWARD, I.K.; SAGE, H.J. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 143 353-355
- 210.- HEDNER, V.; NILSSON, I.M; ROBERTSON, B. (1966)
Thromb. Diath. Haemorrh. 16 38-50
- 211.- OGSTON, C.M.; OGSTON, D.; FULLERTON, H .W. (1968)
Thromb. Diath. Haemorrh. 19 107-116
- 212.- TRAN-THANG, Ch.; KRUTHOF, E.K.O.; BACHMANN, F. (1984)
J. Clin. Invest. 74 2009-2016
- 213.- LUCAS, M.A.; STRAIGHT, D.L.; FRETTO, L.J.; McKEE, P.A.
(1983)
J. Biol. Chem. 258 12171-12177

- 214.- TAKADA, A.; TAKADA, Y.; SUGAWARA, Y. (1984)
Thromb. Res. 33 561-569
- 215.- URANO, T.; TAKADA, Y.; TAKADA, A. (1984)
Thromb. Res. 36 429-435
- 216.- CASTELLINO, F.J.; STRICKLAN, D.K.; MORRIS, J.P.;
SMITH, J.; CHIBBER, B. (1983)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 408 595-601
- 217.- TAKADA, A.; TAKADA, A.; SUGAWARA, Y. (1985)
Thromb. Res. 37 465-475
- 218.- FEARS, R.; HIBBS, M.J.; SMITH, R.A.G. (1985)
Biochem. J. 229 555-558
- 219.- CEDERHOLM-WILLIAMS, S.A.; SWAIN, A. (1979)
Thromb. Res. 16 705-713
- 220.- VARADI, A.; PATTHY, L. (1983)
Biochemistry 22 2440-2446
- 221.- VARADI, A.; PATTHY, L. (1984)
Biochemistry 23 2108-2112
- 222.- RADCLIFFE, R. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 743 422-430
- 223.- LEZHEN, T.I.; KUDINOV, S.A.; MEDVED, L.V. (1986)
FEBS Letters 197 59-62
- 224.- SUENSON, E.; LÜTZEN, O.; THORSEN, S. (1984)
Eur. J. Biochem. 140 513-522
- 225.- HARPEL, P.C.; CHANG, T-S.; VERDERBER, E. (1985)
J. Biol. Chem. 260 4432-4440
- 226.- FRETTO, L.J.; MCKEE, P.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253 6614-6622

- 227.- MIHALYI, E. (1968)
Biochemistry 7 208-223
- 228.- LAKI, K. (1951)
Arch. Biochim. Biophys. 32 317
- 229.- BELITZER, V.A.; VERTSKAJA, T.V.; MANELVA, G.U. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 154 367
- 230.- SQUORIS (1960)
Vox Sang. 5 357
- 231.- KNOS, M.; FRIBERGER, P. (1979)
En "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis" Davidson, J.F. ed. Vol. 4 pp 154-158 Churchill Livingstone
- 232.- CASTELLINO, F.J.; POWELL, J.R.; (1981)
En "Methods in Enzymology". Lorand, L. ed.
Vol. 80 Parte C pp 365-378 Academic Press N.Y.
- 233.- GRAY, W.R.; HARTLEY, B.S. (1963)
Biochem. J. 89 59 379
- 234.- RUPP, C.; SIEVI, R.; FURLAN, M. (1982)
Thromb. Res. 27 117-121
- 235.- WANG, J.L.; EDELMAN, G.M. (1978)
J. Biol. Chem. 253 3000-3007
- 236.- KARONEN, S.L.; MORSKY, P.; SIREN, M.; SEUDERLING, V. (1975)
Anal. Biochem. 67 1-10
- 237.- DIAZ-MAURINO, T.; ALBERT, A. (1981)
Biochim. Biophys. Acta 677 381-389

- 238.- GRALNICK, H.R.; GIVELBERG, H.M.; SHAINOFF, J.R.;
FINLAYSON, J.S. (1971)
J. Clin. Invest. 50 1819-1830
- 239.- SCATCHARD, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 660-672
- 240.- MENTZER, W.C.; LUBIN, B.H. (1979)
Seminars in Hematology 16 115-127
- 241.- WANG, K.; RICHARDS, F. (1975)
J. Biol. Chem. 250 6622-6626
- 242.- SUENSON, E.; THORSEN, S. (1981)
Biochem. J. 197 619-628
- 243.- LAEMLI, U.K. (1970)
Nature (London) 227 680-685
- 244.- SCHAWRTZ, M.L.; PIZZO, S.U.; HILL, R.L.; MCKEE, P.A.
(1971).
J. Clin. Invest. 50 1506
- 245.- ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.;
WOODLOCK, J.J. (1969)
Annal. Biochem. 30 148
- 246.- WEBER, K.; OSBORN, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244 4406-4412
- 247.- CUATRECASAS, P. (1970)
J. Biol. Chem. 245 3059
- 248.- RACKIS, J.J.; SASAME, H.A.; MANN, R.K.; ANDERSON, R.L.;
SMITH, A.K. (1962)
Arch. Biochem. Biophys. 98 471

- 249.- DIAZ-MAURINO, T.; BLANCO, R.; ALBERT, A. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 799 45-50
- 250.- SOLIS, D.; ESTREMER, D.; USOBIAGA, P.; DIAZ-MAURINO, T.
(1986)
Eur. J. Biochem. (enviado a publicar)
- 251.- DAVEY, M.W.; HUANG, J.W.; SULKOWSKI, E.; CARTER, W.A.
(1974)
J. Biol. Chem. 249 6354-6355
- 252.- FANTL, P. (1962)
Science 135 787-788
- 253.- WHITAKER, A.N.; ROWE, E.A.; MASCI, P.P.; JOE, F.
GAFFNEY, P.J. (1980)
Thromb. Res. 19 381-391
- 254.- WOHL, R.C.; SUMMARIA, L.; ARZADON, L.; ROBBINS, K. (1978)
J. Biol. Chem. 253 1402-1407
- 255.- CEDERHOLM-WILLIAMS, S.A.; DE COCK, F.; LIJNEN, H.R.;
COLLEN, D. (1979)
Eur. J. Biochem. 100 125-132
- 256.- DHALL, D.P.; DAWSON, A.A.; MAVOR, G.E. (1978)
Surg. Gynecol. Obstet. 146 15-20
- 257.- SHAH, G.A.; DHALL, D.P. (1983)
Thromb. Res. 32 67-72
- 258.- GAFFNEY, P.J.; JOE, F.; ROWE, E.A.; WHITAKER, A.N. (1981)
Haemostasis 10 301-314
- 259.- SUENSON, E.; PETERSEN, L.Ch. (1986)
Fibrinolysis. Abstracts Eighth International Congress on
Fibrinolysis. n°11

- 260.- SUENSON, E.; PETERSEN, L.Ch. (1986)
Fibrinolysis. Abstracts Eighth International Congress on
Fibrinolysis, n°12
- 261.- CLEMMENSEN, I. (1978)
Thromb. Haemostasis 39 616-623
- 262.- WALLER, E.K.; SCHLEUNING, W-D.; REICH, E. (1983)
Biochem. J. 215 123-131
- 263.- CLEMMENSEN, I.; CHRISTENSEN, F. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 429 591-599
- 264.- OGSTON, D.; BENNET, B.; HERBERT, R.J.; DOUGLAS, A.S.
(1973)
Clin. Sci. 44 73-79
- 265.- WIMAN, B. (1980)
Thromb. Res. 17 143-152
- 266.- CEDERHOLM-WILLIAMS, S.A. (1981)
Thromb. Res. 21 649-654
- 267.- MATSUO, O.; NISHIDA, Y.; AKAZAWA, K.; MIHARA, H. (1982)
Japan J. Physiol. 32 879-883
- 268.- NOSSEL, H.L.; WASSER, J.; KAPLAN, K.L.; LAGAMMA, K.S.;
YUDELMAN, I.; CANFIELD, R.E. (1979)
J. Clin. Invest. 64 1371-1378
- 269.- NOSSEL, H.L. (1981)
Nature 291 165-167
- 270.- OWEN, J.; KVAM, D.; NOSSEL, H.L.; KAPLAN, K.L.;
KERNOFF, P.B.A. (1983)
Blood 61 476-482

- 271.- SOLIS, D.; DIAZ-MAURINO, T.; ALBERT, A. (1986)
Fibrinolysis (enviado a publicar)
- 272.- TANFORD, C.; KAWAHARA, K.; LAPANJE, S. (1967)
J. Amer. Chem. Soc. 89 729-735
- 273.- DIAZ-MAURINO, T.; CASTRO, C.; ALBERT, A. (1982)
Thromb. Res. 27 397-403
- 274.- YOUNG, N.M.; LEON, M.A.; TAKAHASHI, T.; HOWARD, I.K.;
SAGE, H.J. (1971)
J. Biol. Chem. 246 1596-1601
- 275.- DEBRAY, H.; DECONT, D.; STRECKER, G.; SPIK, G.;
MONTREUIL, J. (1981)
Eur. J. Biochem. 117 41-55
- 276.- CIERNIEWSKI, C.S.; EDGINGTON, T.S. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 580 32-43
- 277.- OLEXA, S.A.; BUDZYNSKI, A.Z.; DOOLITTLE, R.F.; COTTRELL,
B.A.; GREENE, T.C. (1981)
Biochemistry 21 6139-6145
- 278.- PLOW, E.F.; EDGINGTON, T.S. (1979)
J. Biol. Chem. 254 672-678
- 279.- MEDVED, L.V.; PRIVALOV, P.L.; UGAROVA, T.P. (1982)
FEBS Letters 146 339-342
- 280.- NIEUWENHUIZEN, W.; VERMOND, A.; VOSKUILEN, M.; TRAAS, D.
W.; VERHEIJEN, J.H. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 748 86-92
- 281.- PRIVALOV, P.L.; MEDVED, L.V. (1982)
J. Mol. Biol. 159 665-683

