

La Homocisteína modifica las redes de Fibrina

Ana María Lauricella

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

Recibido:

Recibido en: 03/11/2006

| Aceptado:

Aceptado en: 28/11/2006

Contacto: Ana María Lauricella - CONTACTO

Resumen

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

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Estudiar el efecto de la homocisteína sobre la estructura y lisabilidad de la fibrina.
- Evaluar el efecto de la homocisteína sobre el proceso fibrinolítico y sus componentes.

El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica demostró que la homocisteína produjo redes compactas y ramificadas (52 ± 6 vs 44 ± 5 fibras/campo, $p = 0,008$), constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control, sugiriendo que su lisis podría estar afectada.

Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy resultaron prolongados (257 ± 16 vs 187 ± 6 minutos, $p < 0,004$) cuando se utilizó el activador del plasminógeno tipo uroquinasa. Sin embargo, no se encontraron diferencias cuando se utilizó activador tisular del plasminógeno. Por otra parte, los tiempos de lisis de fibrina plasmática formada en ausencia de homocisteína no resultaron diferentes de sus correspondientes controles. El aminoácido no modificó la actividad biológica de plasmina, plasminógeno, ni de sus activadores. Por lo tanto, la lisis dificultada estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la homocisteína y no a la acción del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos evaluados.

Estos resultados sugieren que los pacientes hiperhomocisteinémicos producirían un coágulo con una estructura más compacta y más resistente a la lisis, generando un estado

procoagulante in situ.

Este trabajo contribuye al conocimiento de los mecanismos nocivos asociados a la hiperhomocisteinemia.

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

Homocysteine modifies fibrin networks

Abstract

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

The objectives of this work were:

- To study homocysteine effects on fibrin structure and lysis.
- To evaluate homocysteine effects on the fibrinolytic process and components involved.

Quantitative analysis of scanning electronic microscopy has shown that homocysteine-associated networks were more compact and branched than control (52 ± 6 vs 44 ± 5 fibers/field, $p = 0,008$), with shorter and thicker fibers. This tight structure suggests altered fibrinolysis.

The lysis time of homocysteine-related fibrin networks was longer (257 ± 16 vs 187 ± 6 min, $p < 0,004$) when urokinase type plasminogen activator was used. However, there were no differences with tissue-type plasminogen activator. On the other hand, fibrin networks prepared without homocysteine gave similar lysis time when lysis was performed by homocysteine pre-incubated urokinase-type plasminogen activator or the tissue-type plasminogen activator. Homocysteine did not modify biological activities of plasmin, plasminogen and the evaluated activators. Therefore, defective fibrinolysis with urokinase-type plasminogen activator was associated to homocysteine-fibrin structural alterations rather than to effects on the fibrinolytic components.

Results obtained suggest that hyperhomocysteinemic patients could produce tight clots, more resistant to lysis, generating a procoagulant environment in situ.

This work contributes to understand the mechanisms involved in the homocysteine harmful effect.

Key words: Homocysteine, thrombosis, fibrin networks, structure, fibrinolysis.

Introducción

Cuando se produce injuria en un vaso sanguíneo, la pérdida de sangre se detiene por la formación de un tapón hemostático constituido por plaquetas y una red proteica. El fibrinógeno (Fbg; abundante proteína en la circulación) se polimeriza por activación de los factores plasmáticos de la coagulación, formando una red denominada fibrina. Mientras se produce la reconstrucción del vaso dañado, el coágulo se disuelve por la acción del sistema fibrinolítico. La coagulación (formación de la red de fibrina) y la fibrinolisis (su disolución) deben ser comprendidas como un sistema dinámico cuyo fin es mantener una adecuada circulación sanguínea. El desequilibrio entre estos mecanismos provoca falta o exceso de coagulabilidad en el individuo.

Los vasos sanguíneos son conductos de diferente calibre por donde circula la sangre; pueden dilatarse o contraerse para regular el caudal necesario para cada condición o actividad. Su pared, la pared vascular, está formada por una serie de capas elásticas constituídas principalmente por colágeno, elastina y proteoglicanos, que le otorgan resistencia y contractilidad a los vasos. El interior de los vasos está tapizado por una única capa de células llamadas endoteliales, que participan activamente en conservar la luz del vaso, mediar el pasaje de nutrientes y otros solutos a los tejidos, sintetizar sustancias vasoactivas y muchas otras que van a participar en la coagulación y fibrinolisis. En condiciones normales el endotelio no activa la coagulación ni a las plaquetas para generar un trombo. Dicho de otro modo, el endotelio vascular es una superficie no trombogénica.

Las proteínas que constituyen el sistema de coagulación se llaman factores y generalmente se encuentran en circulación en forma de precursores enzimáticos inactivos. Mac Farlane y Davie propusieron un sistema de reacciones consecutivas, donde una enzima activa a su sustrato, el cual se convierte a su vez en una enzima activa para el próximo sustrato, desencadenando un sistema de activación secuencial (1) que conduce a la formación de trombina, la principal enzima del sistema.

La trombina realiza múltiples funciones. Entre ellas, corta específicamente cuatro uniones aminoácidas de la molécula de Fbg? liberando péptidos denominados fibrinopéptidos A y B y generando monómeros de fibrina que se polimerizan dando origen a la red de fibrina soluble. La trombina, además, activa al factor XIII. El factor XIII activado produce uniones covalentes entre las fibras de fibrina soluble generando fibrina estable (2).

La fibrina es degradada por la plasmina, enzima que deriva de la activación del plasminógeno por sus activadores: activador tisular del plasminógeno (t-PA) y activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA).

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido que contiene un grupo sulfhidrilo en su molécula. No es constituyente natural de las proteínas sino que es un producto intermedio en el metabolismo de la metionina. Su concentración en la circulación es muy pequeña: el límite superior de homocisteinemia en individuos sanos, con niveles vitamínicos óptimos es de 12 μM (3-4). Existen muchos factores adquiridos que regulan los niveles de Hcy. La dieta es fundamental: el déficit de ácido fólico, vitaminas B_{12} , B_6 y/o B_2 conduciría/n a niveles plasmáticos elevados del aminoácido, un estado denominado de hiperhomocisteinemia (HHcy). El consumo abundante de alimentos de origen animal debería estar acompañado por cantidades adecuadas de frutas y vegetales frescos que aporten el nivel de ácido fólico suficiente para neutralizar la Hcy generada. La Hcy puede formar compuestos disulfuro con moléculas que contienen grupos tioles, como el aminoácido cisteína o proteínas que tengan libre el sulfhidrilo de los residuos cisteína (5).

Los niveles plasmáticos elevados de Hcy (hiperhomocisteinemia: HHcy), están asociados a muchas alteraciones: neurológicas (6-7), complicaciones obstétricas (8-9), efectos teratogénicos (10), enfermedad aterotrombótica (11-12). Se ha encontrado asociación positiva entre niveles elevados de Hcy y las distintas formas de la enfermedad arterial: infarto de miocardio (13-14), accidente cerebrovascular (15), y venosa: trombosis venosa profunda (16), tromboembolismo pulmonar (17) o venoso (18-19), de modo que la Hcy elevada constituye un

importante factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando al sistema vascular coronario, cerebral y periférico (20-23). La magnitud del riesgo es similar a la de otros factores tales como colesterol elevado, tabaquismo, hipertensión y diabetes que, a su vez, ejercen un efecto multiplicativo cuando se combinan con hiperhomocisteinemia.

Entre los efectos nocivos de la Hcy se ha demostrado la generación de especies oxigenadas, altamente reactivas (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxido), que inducirían injuria en el endotelio vascular (24-25). Se ha sugerido (26) que la HHcy afectaría la vasodilatación del endotelio (por disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico) y las propiedades elásticas de la pared arterial (27) (por el aumento en la síntesis y entrecruzamiento de las fibras de colágeno). Los resultados del efecto de la HHcy sobre las plaquetas y la actividad de los factores de coagulación y el sistema fibrinolítico son contradictorios. Se evidencia un estado hipercoagulable en los pacientes homocistinúricos. Mientras algunos estudios no pudieron vincular HHcy con alteraciones de la actividad de los factores de coagulación (28) ni de la actividad fibrinolítica (29), recientemente se ha informado (30) que la HHcy incrementó la velocidad de coagulación, y disminuyó la actividad fibrinolítica.

A pesar de la extensa bibliografía que apoya la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva, no se ha llegado aún a un consenso sobre los principales mecanismos responsables de esta interacción. La mayoría de los estudios publicados han evaluado la acción de la Hcy en los procesos previos a la generación del trombo; en cambio, en el presente trabajo se ha investigado la estructura de las redes de fibrina y el proceso de lisis posterior.

Para contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de los niveles elevados de Homocisteína con el riesgo de enfermedad vascular oclusiva, se evaluó el efecto *in vitro* del aminoácido sobre la estructura y lisis de la fibrina. Además se estudió el efecto de la Hcy sobre componentes del proceso fibrinolítico: plasmina, plasminógeno y activadores del plasminógeno.

Materiales y Métodos:

Obtención de fibrina

La acción de la trombina sobre el fibrinógeno en solución produce una serie de eventos que culminan con la formación de un gel, cuyo componente sólido (esqueleto) es la fibrina. En los distintos estudios se utilizó una mezcla de plasmas citratados libres de plaquetas, provenientes de individuos normales (*PN**). Alícuotas de *PN**, se incubaron 1 hora, a 37°C con soluciones de la mezcla racémica (DL)-Hcy a diferentes concentraciones. La muestra control se obtuvo reemplazando la solución de Hcy por solución fisiológica (SF). Se utilizó trombina (Trb) y CaCl₂ para coagular una alícuota de la mezcla plasmática preincubada con Hcy o SF. Los efectos de la Hcy sobre la fibrina fueron evaluados mediante microscopía electrónica y estudios líticos.

Estudio de las redes de fibrina por microscopía electrónica

Modificaciones de la estructura de la red de fibrina pueden conducir a fibrinas muy débiles e ineficientes o, por el contrario, a densas tramas difíciles de lizar. Con el fin de esclarecer si la Hcy produce algún efecto sobre la estructura de la fibrina, se obtuvieron geles de fibrina plasmática obtenidos a partir de mezcla de plasmas preincubados con el aminoácido y posteriormente estabilizados. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (30%)-paraformaldehído (2,5%) durante 2 horas; se lavaron con *buffer* cacodilato y fueron postfijadas con tetróxido de osmio (1%). Luego fueron deshidratadas con soluciones de acetona en agua en concentraciones crecientes (50, 70,

85 y 100 %). Las muestras se secaron por punto crítico (Baltec CPD 030, Balzers, Alemania) y fueron metalizadas para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss DMS 940 A, Oberkochen, Alemania) (31). Las observaciones se realizaron a 5 kV y se obtuvieron las fotografías correspondientes para cuantificar las dimensiones de las fibras. Las mediciones sobre las fotografías de las observaciones microscópicas se realizaron con el programa Image J. Se evaluaron al menos 10 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red midiendo: número de fibras por campo, % de red (relación porcentual entre la superficie ocupadas por las fibras respecto al área total del campo), ancho y largo de las fibras.

Determinación de la actividad del sistema plasminógeno-plasmina

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

Evaluación de la lisis de fibrina

Para evaluar la lisis se utilizó un sistema en dos etapas, separando la formación de la fibrina de su lisis. Si la Hcy se coloca antes de formarse la fibrina se estará evaluando la lisabilidad, como propiedad asociada a la estructura de la fibrina. Si se coloca la Hcy junto con el activador del Plg al analizar la lisis de redes iguales, se evalúa exclusivamente el efecto del aminoácido sobre el sistema fibrinolítico.

Se formaron geles de fibrina plasmática utilizando la mezcla plasmática preincubada en presencia de distintas concentraciones de Hcy (c.f. = 500 y 100 μ M) con Trb (c.f.: 0,25 UI/ml) y CaCl_2 (c.f.: 33 mM). Sobre los geles estabilizados se agregó una solución de u-PA (25 UI/pocillo) o t-PA (10 UI/pocillo) en un volumen de 70 μ l. Se monitoreó la DO a 405 nm en función del tiempo.

Resultados

Efecto de Hcy sobre la estructura de las redes de fibrina

En la Figura 1 se muestran las imágenes de las redes de fibrina obtenidas con 3.000 aumentos a partir de plasma preincubado con Hcy 500 μ M y las correspondientes controles. La caracterización de las mismas Figura en la Tabla 1.

lau1.jpg

Figura 1: Redes de fibrina plasmática observadas por microscopía electrónica de barrido: A: SF, B: Hcy 500 μ M.

Tabla 1: Caracterización de las redes de fibrina por microscopía electrónica.

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

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

Las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy 500 μ M, resultaron más compactas y ramificadas que las controles. En presencia de Hcy se formaron redes de fibrina con mayor número de fibras/campo y que esas fibras son más gruesas y cortas que las correspondientes a la fibrina control.

Efecto de Hcy sobre los componentes del sistema plasminógeno-plasmina

Las redes de fibrina formadas en presencia de Hcy mostraron diferente estructura, sugiriendo que serían más resistentes a la lisis. Además, el aminoácido podría afectar la actividad biológica de los componentes del sistema plasminógeno-plasmina, modificando la actividad fibrinolítica. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se desarrollaron estudios cinéticos que permitieron estudiar el efecto de la Hcy sobre:

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

Acción de Hcy sobre la actividad amidolítica de plasmina

El sustrato natural de la plasmina es la fibrina. La plasmina corta uniones pépticas particulares de la fibrina, pero también puede ejercer su acción sobre fragmentos peptídicos que contengan los sitios específicos de corte. Existen reactivos capaces de evidenciar la acción de la enzima denominados sustratos cromogénicos y la actividad enzimática sobre ellos se denomina actividad amidolítica. El sustrato cromogénico contiene para-nitro anilina (p-NA), de modo que mientras que la p-NA liberada por la acción de la plasmita es color amarillo (absorbe a

405 nm), el sustrato cromogénico es incoloro (no absorbe a 405 nm). Por lo tanto la actividad de la plasmina es proporcional a la intensidad del color desarrollado y puede cuantificarse.

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM) sobre la acción amidolítica de Plm, frente a su sustrato cromogénico específico S-2251 (Chromogenix, Milán Italia), en solución reguladora a pH 7,5 determinando la liberación de p-NA (a 405 nm) en función del tiempo, utilizando un lector de ELISA (Reader 100, Organon Técnica, EE.UU) (32). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

laureac1.jpg

Se caracterizaron las curvas obtenidas determinando la pendiente y la DO_{max} máxima. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica

de plasmina a distintas concentraciones de Hcy.

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

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Sigma-Plot. Ninguno de los resultados con Hcy mostró diferencias significativas respecto a los de los controles, indicando que la Hcy ensayada en un amplio rango de concentraciones (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM), no modificó la actividad amidolítica de plasmina (Tabla 2).

Acción de la Hcy sobre la activación de plasminógeno con uroquinasa

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

laurireac2.jpg

Se incubó Plg con Hcy en las concentraciones indicadas (1 h a 37 °C) y se realizó el ensayo cromogénico, en las mismas condiciones experimentales. Los valores de las curvas cinéticas obtenidas figuran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica de plasmina

(por activación de Plg con u-PA) a distintas concentraciones de Hcy.

		Fase Lag (min)	Pendiente (min^{-1})	DO _{max}
PBS		7,1 $\pm$ 0,2	0,046 $\pm$ 0,007	1,827 $\pm$ 0,02
Hcy 63 μM		6,9 $\pm$ 0,5	0,049 $\pm$ 0,001	1,820 $\pm$ 0,03
Hcy 125 μM		7,0 $\pm$ 0,3	0,049 $\pm$ 0,002	1,796 $\pm$ 0,05

Hcy 250 μ M		$7,2 \pm 0,2$	$0,046 \pm 0,004$	$1,799 \pm 0,04$
Hcy 500 μ M		$7,0 \pm 0,4$	$0,046 \pm 0,002$	$1,790 \pm 0,03$
Hcy 1.000 μ M		$6,9 \pm 0,3$	$0,046 \pm 0,002$	$1,801 \pm 0,04$

Los resultados indicaron que el Plg preincubado con distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μ M), no mostró variaciones en la cinética de reacción. En este ensayo se estudia simultáneamente la activación de Plg y la actividad de Plm. Como la actividad de plasmina no se vio modificada por la Hcy, podemos decir que la Hcy tampoco modificó la activación de plasminógeno en estas condiciones experimentales.

Efecto de Hcy sobre la fibrinólisis

De las curvas obtenidas se determinaron los **tiempos de lisis 50 %** –tiempo desde el instante que se agrega al activador del plasminógeno sobre la fibrina hasta alcanzar el valor de DO correspondiente a la mitad del descenso total de DO.

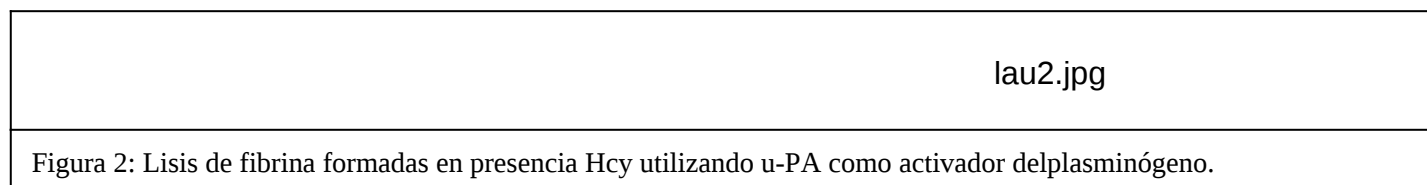


Figura 2: Lisis de fibrina formadas en presencia Hcy utilizando u-PA como activador del plasminógeno.

Como se observa en la Tabla 4, la fibrina obtenida en presencia de Hcy (500 μ M) se lisó más lentamente que la control cuando u-PA fue el activador de plasminógeno utilizado, indicando que la lisis de fibrina en presencia de Hcy está dificultada.

Tabla 4: Tiempos de lisis media de fibrina formada con Hcy, utilizando u-PA como activador de plasminógeno.

		t lisis (min)	p
Control		187 ± 6	
Hcy		257 ± 36	< 0,004

Por otra parte, no se detectaron cambios significativos cuando el activador de plasminógeno usado fue t-PA (Tabla 5).

Tabla 5: Tiempos de lisis media de fibrina obtenida con Hcy, utilizando t-PA

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

Efecto de Hcy sobre la lisis de redes plasmáticas iguales

Se formaron redes de fibrina plasmática a partir de plasma (c.f. = 50 %), con trombina bovina (c.f. = 25 U/ml), y CaCl_2 (c.f. = 33 mM), de manera que todas las redes formadas en esta experiencia fueron iguales. Sobre las redes estabilizadas se agregaron:

- u-PA: (50 U/pocillo) + Hcy (c.f. = 500 μM).

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

b) t-PA (20 U/pocillo) y Hcy (c.f. = 500 μ M).

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

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

Discusión

La trombosis es considerada una patología multicausal resultante de la interacción de factores genéticos y adquiridos. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre los niveles elevados de Hcy y enfermedad vascular. Actualmente, la hiperhomocisteinemia es considerada un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva y en particular para la trombosis. Se han realizado numerosas experiencias *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales con el fin de interpretar la relación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad aterotrombótica, sin embargo los mecanismos involucrados no han sido esclarecidos. La mayoría de los investigadores han estudiado la disfunción endotelial y la actividad procoagulante entre otros efectos dañinos de los niveles elevados de Hcy, evaluando eventos que preceden a la formación del trombo, pero pocos (33) han investigado sobre los efectos del aminoácido luego de iniciado el proceso de coagulación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si la Hcy podría ser responsable de alteraciones en la fibrina. Por estudios de microscopía electrónica, se comprobó que la Hcy produjo cambios en la estructura de la fibrina plasmática, de modo que se formaron redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control.

Sauls y colaboradores (33) mostraron imágenes obtenidas por MEB, de fibrina de plasmas de conejos inyectados intraperitonealmente con DL-Hcy. A semejanza de nuestros resultados, estos autores muestran que los coágulos plasmáticos de animales hiperhomocisteinémicos parecen estar compuestos por fibras más densamente empaquetadas.

Para dilucidar si esta estructura densa podría inducir fibrinólisis defectuosa, se llevaron a cabo experimentos que evaluaron su lisabilidad. Por otro lado, los niveles aumentados de Hcy podrían modificar la cinética de generación de plasmina y/o su actividad biológica. Por lo tanto, se evaluó además, el efecto del aminoácido sobre componentes del sistema plasminógeno-plasmina.

Los resultados obtenidos con u-PA y t-PA se discutirán separadamente. A continuación se discuten las experiencias realizadas con u-PA. Los resultados de la Figura 2 y Tabla 4 muestran que la fibrina asociada a Hcy resultó más difícil de lisar cuando se utilizó u-PA. Por el contrario, cuando se lisaron geles obtenidos en “ausencia de Hcy”, con u-PA preincubado con Hcy, se obtuvieron los mismos tiempos de lisis que el control (u-PA preincubado con SF). Por otra parte, el aminoácido no mostró efecto en la actividad de plasmina (Tabla 2) ni en la activación del Plg (Tabla 3) determinadas por el método amidolítico utilizado, sugiriendo que la Hcy no afectaría a los componentes fibrinolíticos evaluados. Weisel y colaboradores mostraron que la velocidad de fibrinólisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina (34). La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que fibras gruesas son más lentamente lisadas que las finas (35). Por otra parte, redes de fibrina ramificadas y compactas son digeridas con mayor dificultad a causa de la elevada

cantidad de fibras por unidad de volumen y la baja difusión de componentes fibrinolíticos en esta estructura compacta (36). Por lo tanto, considerando que la Hcy indujo redes de fibrina densas y ramificadas, puede postularse que la lisis prolongada con u-PA, estaría más asociada a la estructura compacta de la fibrina que a modificaciones en la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados.

Respecto a la lisis inducida por t-PA de redes de fibrina producidas en presencia de Hcy, se observaron resultados similares al control (Tabla 4). Según lo descripto para el u-PA, la estructura compacta de la fibrina asociada a la Hcy debería haber mostrado tiempos de lisis prolongados. Sin embargo el mecanismo de acción diferente del t-PA explicaría los resultados inesperados. La fibrina, el principal sustrato de la plasmina, une Plg y t-PA y acelera la activación del Plg, mientras que el u-PA no tiene afinidad por la fibrina y activa Plg en fase fluida. La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg depende de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor (37). Entonces, la estructura densa de la fibrina asociada a Hcy sería, por un lado, más difícil de lisar, pero por otro, las fibras más gruesas proveen más sitios de unión a t-PA, favoreciendo la activación del Plg. Estos efectos contrapuestos explicarían que los tiempos de lisis obtenidos con t-PA no mostraran diferencias entre las redes con Hcy y las controles.

Estos resultados coinciden con los reportados en la bibliografía. Sauls *et al* encontraron disminuida la lisabilidad con plasmina, de fibrina obtenida a partir de Fbg aislado de plasma de conejos a los que se administró DL-Hcy (33).

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

Este trabajo fue totalmente realizado *in vitro* para separar los diferentes efectos que ejerce la Hcy y poder postular mecanismos que expliquen la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva. Extrapolar estos resultados a lo que podría pasar *in vivo* tendrían importantes consecuencias, ya que podría inferirse que los pacientes hiperhomocisteinémicos producirían un coágulo con una estructura más compacta y más resistente a la lisis, generando un estado procoagulante *in situ*. Además, la acción de las drogas trombolíticas estaría dificultada. La obstrucción en la circulación conduciría a la alteración de la reología normal y a la secuencia de eventos que desembocarían en enfermedad aterotrombótica. Los resultados de este trabajo contribuyen a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de la hiperhomocisteinemia y el riesgo de trombosis.

ABREVIATURAS

c.f.	Concentración final
DO	Densidad Óptica
Fbg	Fibrinógeno
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiperhomocisteinemia
Plg	Plasminógeno
Plm	Plasmina

p-NA	para-nitro anilina
SF	Solución Fisiológica
t-PA	Activador tisular del Plasminógeno
Trb	Trombina
u-PA	Activador del Plasminógeno, tipo uroquinasa

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires, subsidio (TX 295).

Referencias

1. **Davie E, 1995.** Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thomb Haemost* 74:1-6
2. **Bithell TC.** Blood coagulation. En Wintrobe's Clinical Hematology. Tomo I. *Lea & Febiger* editores, 9ª edición, Londres, 1993; Pag 566-615.
3. **Ubbink J, Becker P, Hayward Vermaak WJ, et al, 1995.** Results of B-Vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem*; 41:1033-1037.
4. **Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, et al, 1996.** Age and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 42:630-636.
5. **Ueland M, 1995.** Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 41:340-342.
6. **Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Andrieu S, et al, 2000.** Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr* 71:643S-649S.
7. **Regland B, Andersson M, Abrahamson L, et al, 1997.** Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol* 26:301-307.
8. **Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al, 2000.** Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 71:962-968.
9. **Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, et al, 2001.** Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185:781-785.
10. **Mc Mullin MF, Young PB, Bailie KE, et al, 2001.** Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B₁₂ deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol* 23:161-165.
11. **Van Guldener C, Stehouwer C, 2000.** Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 26:281-289.

12. **Welch GN, Loscalzo J, 1998.** Homocysteine and atherothrombosis. *N England J Med* 338:1042-1050.
13. **Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, et al, 1996.** Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: finding in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 26:27-34.
14. **Morris MS, Jacques PF, Rosenberg TH, et al, 2000.** Serum total homocysteine concentration is related to self-reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III. *J Nutr* 130:3073-3076.
15. **Miller JW, 1999.** Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr Rev* 57:126-129.
16. **Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, et al, 1995.** Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 345:882-885.
17. **Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, et al, 1994.** High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 14:1080-1083.
18. **Ray JG, 1998.** Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Inter Med* 158:2101-2116.
19. **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al, 1997.** Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 95:1777-1782.
20. **Ebbesen LS, 2004.** Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 50:917-30.
21. **D'Angelo A, Selhub J, 1997.** Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 90:1-11.
22. **Bos MJ, van Goor ML, Koudstaal PJ, et al, 2005.** Plasma homocysteine is a risk factor for recurrent vascular events in young patients with an ischaemic stroke or TIA. *J Neurol* 252:332-7.
23. **Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al, 1997.** Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *JAMA* 277:1775-1781.
24. **Misra H, 1974.** Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols. *J Biol Chem* 249:2151-2155.
25. **Lambert J, van der Berg, Steyn M, et al, 1999.** Familial hyperhomocysteinaemia and endothelium- dependent vasodilation and arterial distensibility of laege arteries. *Cardiovasc Res* 42:743-51.
26. **Mujumdar V, Aru G, Tgagi S, 2001.** Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 82:491-500.
27. **Majors A, Ehrhart L, Pezacka E, 1997.** Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2074-2081.
28. **Quintana I, 2003.** Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático. *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.*
29. **Sabovic M, Blinc A, 2000.** Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. *Eur J Physiol* 440 [Suppl]: R134-R136.

30. **Chia S, Wilson R, Ludlam CA, et al, 2005.** Endothelial dysfunction in patients with recent myocardial infarction and hyperhomocysteinaemia: effects of vitamin supplementation. *Clin Sci* 108:65-72.
31. **Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N et al, 2000.** End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with a B γ -chain extension lead to fragile clot structure. *Blood* 96:3779-85.
32. **Carr ME, Alving BM, 1995.** Effect of fibrin structure on plasmin-mediated dissolution of plasma clots. *Blood Coagul and Fibrinolysis* 6:567-573.
33. **Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M, 2003.** Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 1:300-6.
34. **Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C, 1999.** Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 82:277-282.
35. **Collet JP, Park D, Lesty C, et al, 2000.** Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1354-1361.
36. **Kolev K, Machovich R, 2003.** Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 89:610-21.
37. **Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM, 1992.** The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 267:24259-24263.

Química Viva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Volumen 5, Número 3, Diciembre de 2006

ID artículo: F0040

DOI: no disponible

[Versión online](#)