

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Estudios estructurales de fibrinógeno y fibrina por  
proteolisis controlada**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Dolores Vallejo Ruiz**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310043046

T577.112

UAC

est

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE FIBRINOGENO Y FIBRINA  
POR PROTEOLISIS CONTROLADA**

**MEMORIA**

para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

por

**DOLORES VALLEJO RUIZ**

INSTITUTO DE QUÍMICA-FÍSICA «ROCASOLANO» (C.S.I.C.)



Madrid, Abril 1978

R. 27.987

A mis padres.

El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Coloides del Instituto de Química Física "Rocasolano" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, durante los años 1974 a 1978, bajo la dirección del Profesor de Investigación D. Armando Albert Martínez, a quién expreso mi más sincero agradecimiento.

Quiero hacer constar mi especial gratitud al Dr. D. José Luis Saiz Velasco, Investigador Científico. También quiero agradecer a la Dra. Dña. Pilar Usobiaga Altuna, Investigadora Científica y a todos mis compañeros, la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

Del mismo modo, agradezco a la dirección de este Instituto las facilidades que en él se me han concedido.

## I N D I C E

I.- <u>INTRODUCCION</u> .....	1
II.- <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	31
II.1.- PURIFICACION DEL FIBRINOGENO .....	31
II.2.- PREPARACION DE FIBRINA .....	32
II.2.1.- <u>Obtención del monómero de</u> <u>fibrina</u> .....	33
II.2.2.- <u>Obtención de polímero</u> <u>intermedio de fibrina</u> .....	33
II.2.3.- <u>Obtención de fibrina tramada.</u> ..	34
II.3.- PROTEOLISIS DE FIBRINOGENO .....	36
II.3.1.- <u>Proteolisis con tripsina</u> .....	36
II.3.2.- <u>Determinación del número de</u> <u>enlaces peptídicos rotos por</u> <u>la acción del enzima</u> .....	38
II.3.3.- <u>Posterior tratamiento con</u> <u>trombina</u> .....	39
II.3.4.- <u>Tratamiento con calor</u> .....	39
II.3.5.- <u>Precipitación con TCA</u> .....	39
II.3.6.- <u>Digestión del fibrinógeno o</u> <u>fibrina con plasmina</u> .....	40
II.4.- PROTEOLISIS DE FIBRINA .....	41
II.4.1.- <u>Fibrina en solución</u> .....	41
II.4.1.1.- Con tripsina .....	41

II.4.1.2.- Tratamiento con	
calor .....	42
II.4.1.3.- Con plasmina .....	42
II.4.2.- <u>Coágulo de fibrina tramada</u> ....	43
II.4.2.1.- Digestión con	
tripsina .....	43
II.4.2.2.- Digestión con	
plasmina .....	44
II.5.- ELECTROFORESIS DE ZONA, EN GEL DE POLI-	
ACRILAMIDA Y EN PRESENCIA DE SDS .....	44
II.6.- ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA .....	49
II.6.1.- <u>Determinación de coeficientes</u>	
<u>de sedimentación</u> .....	50
II.7.- REDUCCION DE ENLACES DISULFURO Y	
CARBOXIMETILACION .....	51
II.7.1.- <u>Reducción de enlaces disulfuro.</u>	52
II.7.2.- <u>Carboximetilación</u> .....	53
II.8.- DANSILACION Y DETERMINACION DE	
N-TERMINALES .....	53
II.8.1.- <u>Dansilación de proteínas</u> .....	54
II.8.1.1.- Hidrólisis ácida de	
la proteína .....	55
II.8.2.- <u>Determinación de N-terminales</u> .	56
II.9.- CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL Y	
ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE,	
PERPENDICULAR .....	57

III.- <u>RESULTADOS</u> .....	61
III.1.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO	
BOVINO CON TRIPSINA .....	61
III.1.1.- <u>Estudios cinéticos</u> .....	61
III.1.2.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>trombina</u> .....	63
III.1.3.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>acción de la temperatura</u> ....	64
III.2.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO	
BOVINO CON TRIPSINA EN PRESENCIA DE	
ACIDO $\epsilon$ -AMINOCAPROICO .....	65
III.2.1.- <u>Estudios cinéticos</u> .....	65
III.2.2.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>trombina</u> .....	67
III.2.3.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>acción de la temperatura</u> ....	67
III.3.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO	
HUMANO CON TRIPSINA Y PLASMINA .....	68
III.3.1.- <u>Estudios cinéticos con</u>	
<u>tripsina</u> .....	68
III.3.2.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>trombina</u> .....	72
III.3.3.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>acción de la temperatura</u> ....	73

III.3.4.- <u>Material coagulable en TCA</u>	
<u>al 10%</u> .....	73
III.3.5.- <u>Estudios enzimáticos con</u>	
<u>plasmina</u> .....	74
III.4.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO	
HUMANO CON TRIPSINA EN PRESENCIA DE	
ACIDO $\epsilon$ -AMINOCAPROICO .....	75
III.4.1.- <u>Estudios cinéticos</u> .....	75
III.4.2.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>trombina</u> .....	78
III.4.3.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>acción de la temperatura</u> ....	78
III.4.4.- <u>Material coagulable en TCA</u>	
<u>al 10%</u> .....	78
III.5.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO	
HUMANO CON TRIPSINA EN UREA 3,5M .....	79
III.5.1.- <u>Estudios cinéticos</u> .....	79
III.5.2.- <u>Material coagulable por</u>	
<u>trombina</u> .....	83
III.6.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINA	
SOLUBLE CON TRIPSINA Y PLASMINA .....	84
III.6.1.- <u>Estudios cinéticos sobre fi-</u>	
<u>brina soluble en NaCl 0,15M,</u>	
<u>urea 2,35M, pH 7,5</u> .....	85



III.8.1.- <u>Estudio de las masas moleculares de las cadenas constituyentes</u> .....	108
III.8.2.- <u>Estudio de los aminoácidos N-terminales</u> .....	111
III.9.- ESTUDIO DE LOS PEPTIDOS DE BAJA MASA MOLECULAR MEDIANTE ANALISIS BIDIMENSIONAL POR CROMATOGRAFIA Y ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE .....	112
IV.- <u>DISCUSION</u> .....	116
V.- <u>CONCLUSIONES</u> .....	149
VI.- <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	153

**I.- INTRODUCCION**

El fibrinógeno es una proteína de la sangre responsable en último término de la coagulación y que tiene un gran interés no sólo por su participación en la hemostasia sino por su estrecha vinculación con estados patológicos de gran importancia como son muchas de las enfermedades cardiovasculares. Por tratarse de una proteína compleja, de un tamaño molecular considerable y además imposible de cristalizar hasta la fecha, su estudio ha tenido que abordarse desde un punto de vista quimicofísico con el fin de establecer relaciones entre su función y estructura molecular, tanto a nivel de fibrinógeno como de fibrina insoluble.

Los trabajos iniciales sobre esta molécula se limitaron a la caracterización de sus propiedades fundamentales, pero cada vez hay un interés mayor en conocer su estructura. La masa molecular estimada para el fibrinógeno es  $340.000 \pm 20.000$ , a partir de los estudios de sedimentación y difusión realizados por Shulman (1) y Caspary y Kekwick (2), y de las estimaciones hechas por el método de dispersión de luz de Katz y col. (3).

Estudiada la composición de aminoácidos del fibrinógeno humano, de cerdo, de oveja y de vaca, se ha visto

que son similares, siendo uno de los trabajos más recientes sobre fibrinógeno humano, el realizado en analizador automático por Cartwright y Kekwick (4).

Henschen y Blombäck (5) y Mihalyi y col. (6) demostraron que el fibrinógeno posee una apreciable proporción de aminoácidos di y tricarboxílicos y de aminoácidos aromáticos. Además existen algunos aminoácidos poco comunes como la tirosina-O-sulfato, encontrada por Bettelheim (7), que aparece en la mayoría de los fibrinopéptidos B de distintas especies, aunque no existe en primates superiores y en la rata (Blombäck y Blombäck (8); Wooding y Doolittle (9)).

También se ha determinado la existencia de fósforo contenido en forma de O-fosfoserina; Blombäck y col. (10) encontraron este aminoácido en el fibrinopéptido A de varios primates superiores y del hombre (Blombäck y col. (11)) y también aparece en el perro, según Osbahr y col. (12).

Gracias a los estudios realizados por Krajewski y Cierniewski (13) sobre las subunidades obtenidas por sulfitolisis del fibrinógeno bovino, se ha visto que la mayor parte del contenido de fósforo de la molécula se encuentra en las cadenas B $\beta$  y A $\alpha$ , aunque puede haber pequeñas cantidades de fósforo localizadas en otras zonas del fibrinógeno distintas de los fibrinopéptidos (Blombäck y

col. (14)).

Witt y Müller (15) han observado que el tiempo de coagulación del fibrinógeno por acción de la trombina viene afectado por la cantidad de fósforo presente en la molécula, de forma que se prolonga considerablemente el tiempo de coagulación si el fibrinógeno está desfosforilado.

Por otra parte, en el fibrinógeno de mamíferos existen pequeñas cantidades de hidratos de carbono (4-5%), principalmente hexosas, glucosamina y ácido siálico (16), que son esenciales para la formación del coágulo de fibrina, posiblemente por su interacción en el proceso de estabilización de la molécula, según sugieren Raislys y col. (17). Mosesson y col. (18) mantienen que el contenido de carbohidratos en el fibrinógeno humano nativo es el mismo que en la fracción coagulable de solubilidad intermedia (I-8), existiendo 23 residuos de hexosas, 20 de hexosamina y 6-7 de ácido siálico.

Su distribución en la molécula aún no está claramente determinada. Gaffney (19) ha encontrado que todos los residuos de carbohidrato están unidos a las cadenas B $\beta$  y  $\gamma$ , mientras que la cadena A $\alpha$  no contendría ninguno. Sin embargo, Henschen y Edman (20), mediante análisis de aminoácidos llegan a la conclusión de que hay glucosamina en las 3 cadenas, igual que Mills y Triantaphyllopoulos (21). Según Mester y col. (22) existen 6 cadenas de oligo

sacáridos conteniendo 11 ó 12 residuos de carbohidratos cada una. La unión a la cadena peptídica se produciría en tre restos de N-acetil-glucosamina y asparagina.

Por estudios orientados al conocimiento de los aminoácidos amino-terminales, empleando el método de Edman, Blombäck y Yamashina (23) demostraron que cada molécula de fibrinógeno, con una masa molecular de 340.000, consta de tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes. Posteriormente, McKee y col. (24), Mills y Karpatkin (25) y Pizzo y col. (26) han aislado dichas cadenas del fibrinógeno y han determinado la masa molecular de cada una de ellas, dando los valores de  $68.000 \pm 10\%$ ,  $58.000 \pm 10\%$  y  $47.000 \pm 10\%$ , para las cadenas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente.

Aunque los aminoácidos  $NH_2$ -terminales de cada una de las cadenas varían según las especies, se ha encontrado en un gran número de ellas alanina o treonina en la cadena  $A\alpha$  (Dayhoff (27)). En la cadena  $B\beta$  se observa con bastante frecuencia un residuo de ácido piroglutámico (Blom**ü**bäck y Doolittle (28)(29); Mross y Doolittle (30) y Wooding y Doolittle (9)). Blombäck y Yamashina (23) encuentran tirosina como aminoácido amino terminal, en la mayoría de las cadenas  $\gamma$  de mamíferos.

La determinación de los aminoácidos  $NH_2$ -terminales de fibrinógeno humano se deben a los trabajos de Blombäck y Vestermark (31) y Blombäck y col. (32), que encontraron

alanina, ácido piroglutámico y tirosina, en las cadenas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente.

El análisis de los aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminales ha jugado un papel muy importante en la comprensión del mecanismo de conversión del fibrinógeno a fibrina, por acción de la trombina, puesto que Bailey y col. (33) encontraron que en la fibrina los grupos NH<sub>2</sub>-terminales de dos cadenas eran glicocola, lo que sugería una acción proteolítica limitada por parte de la trombina en el fibrinógeno para transformarlo en fibrina.

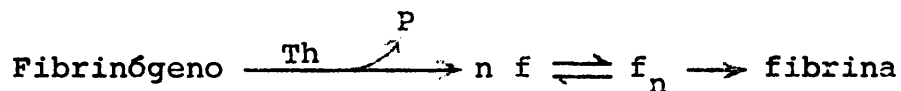
Más tarde, Bettelheim y Bailey (34) demostraron la existencia de dos péptidos diferentes, que actualmente se denominan fibrinopéptidos A y B. La velocidad de separación del péptido A por la trombina era además mayor que la correspondiente al B (Bettelheim (35)), lo que sugiere que estos dos péptidos no desempeñan necesariamente papeles equivalentes.

Esta conclusión viene reforzada por el hecho de que también se obtiene coágulo de fibrina por digestión con ciertas enzimas de serpiente (Blombäck y col. (36)), que sólo separan el fibrinopéptido A.

Mihalyi (37) comprobó que el punto isoeléctrico de la fibrina (5,6) es ligeramente mayor que el del fibrinógeno (5,5). Por otra parte, el monómero de fibrina tiene un momento dipolar transversal apreciable (Haschemeyer

(38)), lo que indica que los fibrinopéptidos no están localizados simétricamente en la molécula con relación al eje longitudinal, sino que se encuentran todos en la misma parte de la molécula.

La polimerización de la fibrina no ocurre según un empaquetamiento totalmente orientado, sino formando principalmente fibras que constituyen una red. La conversión del fibrinógeno en coágulo de fibrina tiene lugar mediante tres etapas sucesivas (Doclittle (39)):



en donde Th es la trombina, P los fibrinopéptidos A y B, f el monómero de fibrina y  $f_n$  el polímero intermedio soluble.

La formación de polímeros intermedios de fibrina ocurre por interacción específica extremo-extremo de las moléculas por fuerzas de carácter electrostático bajo unas condiciones concretas de pH, fuerza iónica, concentración de fibrinógeno y trombina, como estudian Shulman y col. (40).

Por agregación lateral menos específica (Ferry (41)) de los polímeros intermedios, se llega al estado final de formación de gel. Este último proceso es sensible también al pH, fuerza iónica, etc.

Ferry y Morrison (42) clasificaron los geles de fi

brina en gruesos, cuyo aspecto era muy opaco, y fino (transparentes), aunque existen todos los estados intermedios. La formación de un tipo u otro de coágulo depende de las condiciones en que se han producido. Los coágulos opacos se forman a pH moderadamente bajo (6-7) y baja fuerza iónica (0,1-0,2), y están constituidos por fibras gruesas. Sin embargo, en la formación de coágulos finos predomina el proceso de interacción específica y ocurre a pH más elevado (8-9) y fuerza iónica mayor (0,3-0,5). No obstante, intervienen otros factores como es la concentración del fibrinógeno.

En los geles de fibrina formados "in vivo" existen ciertas diferencias con respecto a los obtenidos "in vitro" con fibrinógeno purificado (Doolittle (39)). En los primeros, las fibras tienden a englobar los elementos de la sangre, incluyendo glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Las plaquetas contienen una proteína con propiedades contractiles, lo que hace posible la retracción natural del coágulo con la consiguiente exclusión de los fluidos embebidos. En cualquier caso la fibrina obtenida "in vivo" es insoluble en altas concentraciones de urea o de clorhidrato de guanidina, contrariamente a lo que ocurre con la fibrina preparada en el laboratorio a partir de fibrinógeno. Sin embargo, si el coágulo se forma en presencia del factor XIII, o factor estabilizador de fibrina y de iones

calcio, se hace insoluble a la acción de ácido y base diluidos (Robbins (43)) y soluciones muy concentradas de urea (Laki y Lorand (44)), lo que indica que las uniones entre los monómeros de fibrina en el coágulo "in vivo" son de naturaleza covalente. Actualmente se sabe que la unión ocurre por transaminación catalizada por el factor XIII entre los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina que actúan como donadores y los  $\gamma$ -amino de la glutamina, que actúan como aceptores (Chen y Doolittle (45)).

El estudio de la estabilización de la fibrina es interesante por las repercusiones que ésta tiene en las propiedades del coágulo, y además desde un punto de vista estructural, ya que basándose en la existencia de enlaces covalentes entre los monómeros de fibrina se pueden sacar conclusiones importantes para el conocimiento de la geometría y estructura de las regiones implicadas en el tramado y en el modo en que las moléculas de fibrina se empaquetan durante el proceso de polimerización inicial, puesto que por microscopía electrónica no se ha observado ninguna diferencia entre fibrina tramada y no tramada (46).

Inicialmente Chen y Doolittle (47) observaron que en el tramado de la fibrina intervenían solamente las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ , quedando excluidas las cadenas  $\beta$  en el proceso de estabilización. Poco después se demostró que los enlaces covalentes se establecen a dos niveles moleculares,

por un lado mediante la unión de dos cadenas  $\gamma$  de moléculas vecinas obteniéndose por reducción total dímeros  $\gamma$ - $\gamma$  y por otro por la formación de enlaces sólo entre cadenas  $\alpha$  formándose multímeros, siendo este proceso más lento en condiciones normales que el que implica las cadenas  $\gamma$ .

Por estudios de microscopía electrónica de las moléculas de fibrinógeno, pulverizadas sobre una superficie de mica, Hall y Slayter (48), observaron la presencia de esferas, bien aisladas o formando grupos de dos o tres, aunque las "triadas" eran las más frecuentes. Esto llevó a la concepción de un modelo de fibrinógeno en el que 3 esferas estarían unidas por una estructura filamentosa, de 8 a 15 Å de diámetro, no observada en las microfotografías. Las esferas de los extremos serían de igual tamaño y ligeramente más gruesas que la central. La molécula constituida por las tres esferas tendría una longitud total mínima de  $475 \pm 25$  Å y un diámetro de 70 Å para las esferas mayores. Estas dimensiones explicaban en buena parte los resultados de los estudios hidrodinámicos y de dispersión de luz, por lo que el modelo fué generalmente aceptado.

Estudios de Johnson y Mihalyi (49) demostraron que entre las cadenas de fibrinógeno existen puentes disulfuro covalentes que no se rompen ni siquiera en guanidina-HCl 5M. Esto indica que para separar una esfera de la mo-

lécua patrón se necesitaría la rotura de, al menos, tres uniones peptídicas. Por otro lado, Köppel (50), por estudios en microscopio electrónico empleando una técnica de tinción negativa llegó a la conclusión de que la estructura del fibrinógeno corresponde a la de un dodecaedro pentagonal, en el que las aristas estarían constituidas por las cadenas polipeptídicas del fibrinógeno. Este modelo molecular, que explica también las propiedades hidrodinámicas de la molécula incluso mejor que el modelo trinodular (51) presenta serios inconvenientes para explicar la poca reactividad de la molécula frente a agentes químicos y los productos de degradación por ataque enzimático, además de requerir que el volumen molecular estaría constituido en casi un 90% por agua.

Estudios más recientes por microscopía electrónica del fibrinógeno y fragmentos obtenidos por degradación plásmica (52) así como de la fibrina parcialmente polimerizada (53) (54) (55) muestran para el fibrinógeno una forma esférica, si bien por acción de la trombina o durante las primeras etapas de ataque con plasmina sufre un cambio apareciendo una forma lineal constituida por nódulos conectados por filamentos delgados, en algunos aspectos semejantes a los observados por Hall y Slayter.

A pesar de todos estos trabajos continua la incertidumbre sobre varios aspectos de la estructura del fibrinógeno.

nógeno. Los estudios realizados durante estos últimos años sobre la molécula de fibrinógeno fragmentada, son los que han permitido un mayor conocimiento de su estructura.

Para dicha fragmentación se han empleado métodos químicos y métodos enzimáticos.

Mediante el método de fragmentación química con BrCN, Blombäck y col. (56, 57, 58) separaron un fragmento constituido por dos subunidades idénticas (Blombäck y col. (23) y Henschen (59)) que contiene las regiones  $\text{NH}_2$ -terminales de los tres tipos de cadenas, unidas por puentes disulfuro intercadenas y que denominaron nudo disulfuro  $\text{NH}_2$ -terminal (N-DSK). Este fragmento contiene el 40% de los residuos de cisteína (60) del fibrinógeno y determinaciones recientes realizadas por Woods y col. (61) dan una masa molecular promedio de 57.000-60.000.

Por estudios realizados por Blombäck y col. (62) sobre la estructura primaria del N-DSK se conoce que el fragmento de la cadena "A" $\alpha$  contiene el fibrinopéptido "A" y tiene una longitud de 51 ó 50 aminoácidos, según proceda de la cadena  $\text{A}\alpha$  o  $\text{A}\text{P}\alpha$  o de la cadena  $\text{A}\text{Y}\alpha$ , respectivamente. El fibrinopéptido "A" se separa por trombina de este fragmento, sin depender la especificidad de la enzima de los residuos de cisteína 28, 36, 45 y 49 ni de los residuos 33 y 41 de triptófano (60).

La masa molecular obtenida para el fragmento de la cadena  $\text{B}\beta$  por ultracentrifugación fué de 12.000 y de

14.000 por electroforesis en SDS (Hessel y col. (60)), lo que supone un 20% de la cadena B $\beta$ . Este fragmento está constituido por 118 residuos. Además se aislaron pequeñas cantidades de un fragmento relacionado con la cadena B $\beta$ , y de masa molecular aproximada de 30.000, debido a la rotura incompleta por el residuo 118 de metionina con BrCN (60).

Para el fragmento de cadena  $\gamma$  del N-DSK, Blombäck y col. (63) obtuvieron unos valores de 11.500 por ultracentrifugación y de 12.700 por electroforesis, estando formado por 78 residuos. Esta cadena contiene carbohidratos que están unidos por un resto de N-acetilglucosamina; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mills y Liener (64) después de digestión triptica de la cadena  $\gamma$  intacta.

Además del N-DSK existen otros fragmentos producidos por BrCN, que contienen puentes disulfuro y que pueden ser hidrofílicos (H1) o hidrofóbicos (H0).

El otro fragmento hidrofílico conocido, además del N-DSK, es el H12-DSK (Hessel (60) y Mosesson y Finlayson (65)), que procede de la cadena A $\alpha$  del fibrinógeno. Posee una masa molecular de 28.000 antes y después de reducción y tiene un alto contenido en Thr, Ser, Gly y Pro; además consta de 2 medias Cys, como parte de un puente disulfuro intracadena.

Por otro lado, se han localizado 4 fragmentos hidrofóbicos (Ho1-DSK a Ho4-DSK) (Mosesson y Finlayson (65)) . Actualmente se considera que los fragmentos Ho1-DSK, Ho2-DSK y Ho3-DSK son monoméricos (66, 67), pero no se conocen detalles del Ho4-DSK.

El fragmento Ho1-DSK (H1-DSK) tiene una masa molecular estimada de 34.000 y consta de dos tipos de fragmentos de cadenas, de masas moleculares 21.000 y 7.000, en una relación 1:2, respectivamente. Sin embargo, los fragmentos Ho2-DSK (H2-DSK) y Ho3-DSK (H3-DSK) constan de un sólo fragmento de cadena con unas masas moleculares de 6.000 y 8.000, respectivamente.

En los métodos enzimáticos de fragmentación se han empleado diversas enzimas endopeptidasas, siendo la plasmina una de las más usadas por ser la que se encarga "in vivo" de degradar el coágulo de fibrina.

Se ha visto que desde el comienzo del ataque enzimático hasta la obtención de los productos finales resistentes al enzima se pasa por una serie de etapas intermedias, de forma que se consideran 3 estados de digestión (65):

Estado 1 - Existen especies coagulables por trombina.

Estado 2 - Existen fragmentos resistentes con determinantes antigénicos D y E, pero no

hay especies coagulables.

Estado 3 - Existen especies resistentes que poseen determinantes antigénicos D ó E, pero no ambos.

Los resultados obtenidos se han interpretado de dos maneras algo diferentes. Para una gran parte de los inves tigadores en este campo, los resultados se explican con un modelo de estructura trinodular y simétrico con un nó dulo central constituido por dos extremos N-terminales uni dos por puentes disulfuro y otros dos idénticos monoméricos. Sin embargo, existen discrepancias en las magnitudes quimicofísicas de los fragmentos obtenidos, que justifican la opinión de otros investigadores principalmente Mossesson y Finlayson (65), según los cuales el fibrinógeno tiene una estructura dimérica que afecta a todas las partes importantes de la molécula. Esta estructura dimérica estabilizada por puentes disulfuro, no sólo a nivel de nu do N-terminal sino en zonas más próximas a los C-terminales, daría un esquema de degradación molecular con una ci nética y unos fragmentos distintos a los correspondientes a una molécula con tres nó dulos, dos de los cuales son idénticos y no están unidos entre sí por enlaces disulfuro.

Durante el estado 1 de hidrólisis, el fibrinógeno es atacado por la plasmina, por los extremos COOH-terminales de las cadenas  $\text{A}\alpha$  (Hessel (60)). Con ello aparece un

producto intermedio de cadena  $\alpha$  de masa molecular 40.000-50.000 que comprende los dos tercios de la cadena  $A\alpha$  a partir del extremo COOH-terminal. Este fragmento se degrada a su vez dando un fragmento identificado como Hi2-Ala ( $M_w = 25.000$ ) y pequeños péptidos.

Se ha demostrado que tanto el fragmento inicial de masa molecular 40.000-50.000 como Hi2-Ala tienen estructuras en común con Hi2-DSK (60). Es posible que los tres fragmentos contengan el residuo COOH-terminal de la cadena  $A\alpha$ .

También ocurren roturas en otras regiones, aunque a menor velocidad (Mosesson y Doolittle (65)). De esta forma se desprenden pequeños péptidos del extremo COOH-terminal de la cadena  $\gamma$  y probablemente del extremo  $NH_2$ -terminal de la cadena  $B\beta$  (Furlan y Beck (68)) y se producen ataques internos en los tres tipos de cadenas.

Durante la segunda etapa de proteólisis continúan las roturas internas iniciadas en el estado 1, dirigidas a la separación de los fragmentos D, ya estudiados por Nussenzweig y col. (69). Marder y col. (70) observan la aparición de un fragmento homogéneo de masa molecular  $155.000 \pm 10\%$ , denominado Y. Nussenzweig y col. (69) y Marder y col. (70) ponen de manifiesto que los determinantes antigénicos del fragmento Y son los X-Y, D y E, ya que conserva los mismos aminoácidos  $NH_2$ -terminales (71, 72), ha-

biendo perdido fragmentos por el extremo COOH-terminal de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de una de las dos subunidades, permaneciendo invariable la otra.

Sin embargo, entre los fragmentos D obtenidos existe una gran variedad, presentando diferencias en su masa molecular y en algunas de sus propiedades. Nussenzweig y col. (69), Marder y col. (70) y Dudek y col. (73), entre otros investigadores, les asignan una masa molecular de 80.000-100.000 $\pm$ 10%.

Heene y Matthias (74) encontraron que sólo quedaba retenido en una columna de Sepharosa activada con monómero de fibrina, el fragmento D de masa molecular más elevada, mientras que el D de masa molecular menor presentaba sólo una débil afinidad por la columna.

El fragmento D retenido en Sepharosa y purificado dió por electroporesis en gel de poliacrilamida (EGPA) con SDS (Hessel (60)) una masa molecular de 105.000-115.000 y pequeños conjuntos de material más pesado, y por ultracentrifugación se detectó un componente principal de 5 S y pequeñas cantidades de una especie molecular de 7 S.

Por reducción total de enlaces disulfuro de esta especie se pudo ver que está constituido por 3 ó 4 fragmentos de cadenas, de masas moleculares 45.000, 42.500, 39.500 y 14.000. Los fragmentos de 45.000 y 14.000 corresponden a restos de las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente y, por tan

to se les denomina  $D\beta$  y  $D\alpha$ , encontrándose en cantidades constantes en todas las digestiones.

Sin embargo, los fragmentos de 42.500 y 39.500 proceden de la cadena  $\gamma$  ( $D\gamma_1$  y  $D\gamma_2$ , respectivamente) y se encuentran en relación variable, dependiendo del estado de digestión.

El fragmento  $D\gamma_1$  tiene 16 residuos en el extremo  $NH_2$ -terminal que son comunes con los del extremo  $COOH$ -terminal de la cadena  $\gamma$  del N-DSK (aminoácidos 63 a 78), es decir, hay cierto solapamiento entre los fragmentos plásmicos y los obtenidos con BrCN (60). Por rotura de un segmento peptídico del fragmento  $D\gamma_1$  por la unión Lys-Ser en posición  $\gamma 85-86$  (fragmento  $\gamma 63-85$ ) se produce  $D\gamma_2$ .

Estos datos están de acuerdo con los resultados de  $NH_2$ -terminales obtenidos por Furlan y col. (75) y Takagi y Doolittle (76). En el fragmento D temprano existen Asp y Ala como aminoácidos  $NH_2$ -terminales, mientras que en estudios más avanzados de digestión, los valores de Ala son menores y aumentan los de Ser. Dichos resultados concuerdan con la existencia de determinantes antigénicos exclusivos del D, para este fragmento (69) (70).

Se ha encontrado que los fragmentos Hol-DSK a Ho4-DSK (Mosesson y Finlayson (65)) solapan aparentemente con el fragmento D.

También en este estado y de una forma algo más len

ta, tiene lugar la separación de la porción COOH-terminal de la cadena B $\beta$  (Mosesson y Finlayson (65)).

Durante el tercer estado tiene lugar la aparición de los fragmentos E por la escisión del Y, que da lugar a dicho E y a un fragmento D de iguales características al formado en el estado 2. Ya en 1961 Nussenzweig y col. (69) demostraron que por hidrólisis suficientemente prolongada de fibrinógeno con plasmina se obtienen los fragmentos D y E.

En el fragmento E obtenido en estados de digestión relativamente tempranos, Marder y Budzynski (71, 72) han detectado restos de fibrinopéptidos A y su masa molecular estimada por Marder y col. (70), Dudek y col. (73) y Pizzo y col. (26, 77) es de  $45.000 \pm 10\%$ .

Está constituido por tres tipos de fragmentos de cadenas cuyas masas moleculares han sido determinadas por Kowalska-Loth y col. (78), Pizzo y col. (77) y Budzynski y col. (72), siendo de  $10.000 \pm 10\%$ ,  $7.000 \pm 10\%$  y  $9.000 \pm 10\%$  para los fragmentos de las cadenas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente.

Kowalska-Loth y col. (78) han demostrado que la mayor parte de la estructura del fragmento E y del N-DSK es común, aunque el E tiene algunas secuencias que no están presentes en el N-DSK. Por otra parte, varios investigadores (79, 70) han demostrado determinantes antigénicos co-

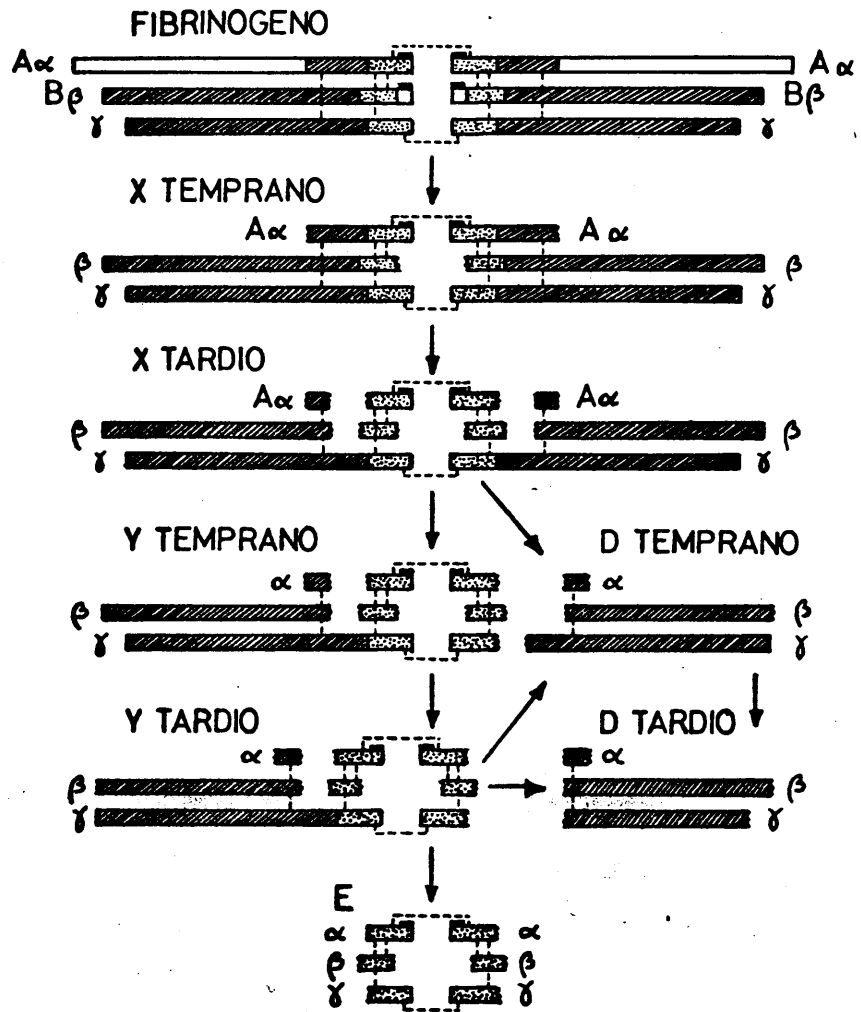
munes y que es resistente a la hidrólisis con plasmina. Dada la masa molecular total del fragmento E, la de sus fragmentos de cadenas constituyentes y su solapamiento con el N-DSK, se tiene la seguridad de la estructura dimerica de E.

En etapas muy avanzadas de este último estado, por rotura lenta de las cadenas  $\gamma$ , algo más resistentes a la plasmina, del fragmento D, mediante una secuencia de ataque no determinada, se producen los fragmentos F, que conservan por lo menos un determinante antigénico presente en el fragmento D, según los experimentos realizados por Mosesson y col. (80).

De todos los fragmentos obtenidos, los más importantes fisiológicamente son los X e Y, ya que poseen una potente capacidad anticoagulante por interferencia en la polimerización del monómero de fibrina y por inhibición de la velocidad de rotura de fibrinopéptidos por trombina (81).

La secuencia de degradación del fibrinógeno producida por la plasmina tiene razón de ser para una molécula de fibrinógeno con tres regiones compactas. La región central de naturaleza dimerica correspondería al fragmento E y dos regiones laterales idénticas entre sí, se identificarían con los fragmentos D.

Estas teorías vienen apoyadas por el hecho, obser-



ESQUEMA DE DEGRADACION DEL FIBRINOGENO HUMANO  
CON PLASMINA, SEGUN DOOLITTLE

vado experimentalmente, de la aparición del fragmento D simultáneamente al Y y anterior a la producción de conjuntos apreciables de E.

Budzynski y col. (72) comprueban que hay fragmentos menores a 13.000 en la especie Y pero no en la X. Estos componentes corresponden al fragmento E y, por tanto, constituye una prueba de que existe una sóla especie E y, sin embargo, dos fragmentos D por molécula de fibrinógeno inicial.

Por digestión de fibrina con plasmina también se obtienen fragmentos X, Y, D y E con propiedades equivalentes a los obtenidos por digestión de fibrinógeno, según comprueban Dudek y col. (73). Esto indica que por el proceso de polimerización no quedan expuestas nuevas regiones al ataque, ni desaparecen los sitios que ya eran accesibles.

Weinstein y Doolittle (82) observan que la disolución del coágulo de fibrina por la plasmina tiene lugar cuando se degradan un número crítico de monómeros de fibrina para dar fragmentos Y y D, y comprueban que este hecho ocurre cuando se rompen 4-8 enlaces, para una masa molecular de 340.000; sin embargo, se producen muchas roturas más hasta llegar a obtener todos los fragmentos resistentes. El fragmento Y formado a partir de fibrina, posee la misma capacidad anticoagulante que el que produce la

plasmina a partir del fibrinógeno.

A pesar del esquema de degradación semejante seguido por el fibrinógeno y fibrina por acción de la plasmina y de la semejanza de los productos de degradación obtenidos en ambos procesos, se han visto, por microscopía electrónica, unos cambios conformacionales muy grandes a lo largo de los diferentes estados de polimerización, de manera que la forma original del fibrinógeno sólo se mantiene en los primeros estados de agregación (Pouit y col. (53)).

En el fibrinógeno existe una heterogeneidad en la distribución de la carga eléctrica: Arnesen (83) determina el pI de los fragmentos D y E, que presentan gran diferencia, 6,6 y 4,9, respectivamente. Hudry-Clergeon y col. (84) sostienen que este hecho puede dar lugar a interacciones electrostáticas intramoleculares, que reforzadas por otros tipos de enlaces, estabilizarían una conformación molecular determinada.

La rotura de los fibrinopéptidos A y B, que tienen un carácter electronegativo, por acción de la trombina, justifica un cambio conformacional que llevaría a la neutralización. El hecho de que los fibrinopéptidos B se separen más lentamente que los A apoya la existencia de un cambio conformacional en la región  $\text{NH}_2$ -terminal de la molécula (85) mediante el cual la región que contiene el en

lace que corta la trombina para liberar el péptido B que inicialmente está oculto, se expone a la acción proteolítica del enzima.

La asociación de los monómeros de fibrina ocurre gracias a una perfecta orientación de las moléculas, ya que necesita interacciones entre sitios específicos, habiéndose hecho accesibles algunos de ellos al producirse el cambio conformacional en la molécula. Pouit y col. (55) sugieren la aparición de sitios cargados positivamente en la molécula durante la polimerización, debido al cambio conformacional producido.

Según Mattock y Esnouf (86) la dimerización  $\gamma$ - $\gamma$  ocurre nada más separarse los fibrinopéptidos A. Chen y Doolittle (87) han localizado un doble tramado cerca de la región COOH-terminal de las cadenas  $\gamma$ . Este proceso lleva a la formación de polímeros intermedios.

Sin embargo, la cadena  $\alpha$  forma multímeros (39). Esto puede deberse a que hay más de un sitio de enlace implicado y/o que los sitios donador y aceptor de una cadena  $\alpha$  interaccionan con un aceptor y un donador situados en dos cadenas  $\alpha$  pertenecientes a distintas moléculas. Doolittle y col. (88) defienden que hay dos sitios aceptores en las cadenas  $\alpha$ , por lo menos (aunque esto no implica forzosamente que ambos participen en el tramado) y se ha visto que al menos alguno está situado en la región

COOH-terminal. Este proceso es mucho más lento que la formación de dímeros  $\gamma$ - $\gamma$  y da lugar a la agregación lateral (39) por lo que tiene gran importancia en la formación de coágulos gruesos.

Para conciliar todos estos resultados, Hudry-Clergeon y col. (84) suponen que el fibrinógeno puede existir bajo distintas formas conformacionales que varían entre la replegada, con una forma esferoidal con los extremos casi unidos, y la extendida en forma de T y cuyas proporciones relativas dependerían de la temperatura, pH, fuerza iónica, naturaleza de los disolventes y concentración de la proteína. En condiciones fisiológicas predominaría la forma esférica.

En el paso de fibrinógeno a fibrina habría un desplegamiento de la molécula, que adoptaría la forma de T. Esta forma de T estaría en bastante concordancia con el modelo dado por Doolittle (39), que también opina que el fibrinógeno no puede ser tan compacto como se deduce de las micrografías de Hall y Slayter (48), aunque debe de haber tres macrodominios discretos.

Sin embargo, Mosesson y Finlayson (65) interpretan de otro modo los resultados obtenidos por proteolisis de fibrinógeno y fibrina con plasmina. Afirman que por rotura de los 3 puentes disulfuro que unen las dos mitades del N-DSK, no se separa en dos la molécula, por lo que

tiene que haber, al menos, otro puente disulfuro simétrico en la molécula, suponiendo que los puentes disulfuro son los únicos que impiden la disociación de las dos mitades de fibrinógeno en presencia de urea 4M. Esto les lleva a pensar en la formación de un sólo E y un sólo D, ambos diméricos, por digestión enzimática del fibrinógeno.

Esta hipótesis está apoyada por los resultados de Gormsen y col. (89) que observan que por digestión de fibrinógeno con plasmina, la aparición de fragmentos D y E es simultánea.

Mosesson propuso este modelo (80) porque encontró 2 residuos de Asp  $\text{NH}_2$ -terminales en el fragmento D, por mol, e interpretaron que correspondían a la cadena  $\gamma$ . Sin embargo, Collen y col. (90) encuentran un fragmento D homogéneo de masa molecular 100.000 que contiene Asp como aminoácido  $\text{NH}_2$ -terminal de las cadenas  $\text{D}\alpha$  y  $\text{D}\beta$ , mientras que en la cadena  $\text{D}\gamma$  no encuentran sitio de rotura plásmica que pueda dar Asp.

Una confirmación del modelo sería encontrar entre los productos de degradación de la fibrina tramada una banda de elevada masa molecular que contuviera un oligómero del fragmento D, ya que para la estructura trinodular no pueden existir más de dos especies moleculares unidas covalentemente sin que esté también el fragmento E. Sin embargo, no se ha comprobado hasta el momento la existen-

cia de dicho fragmento de elevada masa molecular.

Para realizar los estudios sobre la estructura del fibrinógeno por digestión enzimática, no sólo se ha empleado plasmina sino también otras muchas enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina, estreptokinasa, etc.

Mihalyi y Godfrey (91) han estudiado el efecto de la quimotripsina sobre el fibrinógeno bovino y de una forma más detallada, los efectos de la tripsina a distintos pH, sobre el fibrinógeno bovino (92). Recientemente Shragger y col. (93) han realizado un estudio comparativo sobre los productos de digestión obtenidos por tripsina y plasmina sobre fibrinógeno bovino y humano.

Se ha comprobado que los productos obtenidos para ambos tipos de fibrinógeno por la acción de estas tres enzimas es comparable en general; aunque pueden señalarse algunas pequeñas diferencias.

Mihalyi y Godfrey (92) realizando digestiones de fibrinógeno con tripsina observan 2 tipos de reacciones: una reacción rápida en la que se rompen 12 uniones peptídicas y una lenta en la que se produce la rotura de otros 80 enlaces, y coincide con la formación de un fragmento 5 S. Estos resultados son similares a los obtenidos con plasmina.

Para la tripsina existe además una tercera reacción extremadamente lenta (94) en la que se forma un frag

mento de 3,7 S.

Durante la primera etapa se separa un 20% de la masa inicial de fibrinógeno en forma de pequeños péptidos por la acción de la quimotripsina y queda un fragmento restante X, que es coagulable por calor (Fletcher y col. (95)). Sin embargo, con la tripsina, además del fragmento X definido por Mills y Karpatkin (25, 96), se encuentra un fragmento de masa molecular 35.000 procedente del extremo COOH-terminal de cada una de las cadenas A $\alpha$ , que rápidamente se rompe en dos de 17.000 (Mihalyi (97)) y un 4% de péptidos pequeños no modificables por acción posterior con tripsina y solubles en TCA.

En la segunda reacción aparece un fragmento 5 S que se ha identificado como el D. Pero el hecho de que la desaparición del fibrinógeno y primer derivado (X) no coincidiera complementariamente con la formación del fragmento D, indicó que tenía que formarse otra especie intermedia que más tarde se detectó y denominó Y.

El esquema general de fragmentación se puede representar de la siguiente manera:

- a - Fibrinógeno - Fragmento X + péptidos
- b - Fragmento X - Fragmento Y + Fragmento D + péptidos
- c - Fragmento Y + Fragmento D + Fragmento E

La primera reacción es muy rápida frente a las otras dos y por otro lado, si la molécula es simétrica y

constituida por dos fragmentos D y un E la velocidad de las reacciones b y c debería de ser igual ya que la probabilidad de ruptura de un fragmento X para dar un Y y un D debe de ser la misma que para que se rompa un Y para dar un D y un E.

Albert y col. (98) demostraron en el caso de la degradación de fibrinógeno bovino con tripsina, que la constante de velocidad global para las reacciones b y c son idénticas, lo que confirma la existencia de una estructura molecular con tres zonas de la molécula densamente empaquetadas que no tienen las cadenas accesibles al enzima. Una de estas zonas o nódulos en una posición central está conectada a las otras dos laterales idénticas entre sí por dos zonas que pueden ser cortadas por ataque enzimático. Las masas moleculares determinadas por equilibrio de sedimentación para los fragmentos resultantes por acción de la tripsina son de 266.800, 170.000 y 90.000 para los fragmentos X, Y y D, respectivamente. La masa molecular determinada para el fragmento E por electroforesis en SDS fué de 46.000-50.000.

Una forma dimérica temprana del fragmento D con una masa molecular de  $\approx 170.000$  como proponen Mosesson y col. (80) tendría un comportamiento cinético distinto al observado independientemente por Albert y col. (98) y por Mihalyi y col. (97). El hecho de que las dos etapas b y c

tengan la misma constante de velocidad apoya una estructura simétrica con un fragmento E en posición central y dos fragmentos D no unidos entre sí en posición lateral.

Se ha comprobado que la tripsina y la trombina tienen especificidades muy semejantes (92), de forma que entre los 12 enlaces rotos por la tripsina durante la reacción rápida (contabilizados en un pH-estato) se incluyen los 4 enlaces accesibles a la acción de la trombina. Además de éstos, sólo se pueden romper 1 ó 2 enlaces más, sin que haya pérdida de coagulabilidad. De este hecho se deduce que se formará por acción de la tripsina una especie intermedia idéntica o muy semejante a la fibrina con capacidad de formar un polímero.

Mihalyi (92) ha visto que las velocidades de formación de esta especie ( $k_1$ ) y de destrucción de ella ( $k_2$ ) son relativamente semejantes:  $k_1/k_2 = 0,65$ .

También en este caso se ha observado la capacidad anticoagulante de los productos de degradación formados, al igual que en el caso de la acción plásmica.

Celander y Guest (99) defienden que el fibrinógeno es mucho más resistente al ataque enzimático que la fibrina. Sin embargo, la fibrina tramada en presencia del factor XIII es degradada 5 a 10 veces más lentamente que la fibrina soluble en urea (Gormsen y col. (100)).

Al ser los resultados obtenidos por proteólisis con

tripsina consistentes con los que se derivan de la acción plásmica o con BrCN, se puede mantener la teoría de la existencia de tres macrodominios en la estructura del fibrinógeno (48) e inclusive apoya el modelo sugerido por Hudry-Clergeon y col. (84). Además, el uso de esta enzima tiene el doble interés de reproducir la acción de la trombina, como ya se ha indicado (92).

El trabajo descrito en esta Memoria ha tenido un doble objeto: Por una parte un mejor conocimiento de las etapas iniciales de degradación del fibrinógeno bovino y humano por acción de la tripsina, caracterizando tanto los fragmentos de alta masa molecular, como los peptídicos producidos. El interés de este aspecto del trabajo reside en que la tripsina produce en las primeras etapas de la proteólisis coagulación del fibrinógeno, a diferencia de lo observado con plasmina. Un estudio de esta coagulación seguida de la disolución del coágulo al progresar la degradación enzimática, puede suministrar información acerca de los aspectos moleculares implicados en el paso de la fibrina insoluble a los fragmentos de masa molecular elevada solubles, que inhiben la polimerización de fibrina y la formación de un coágulo consistente.

Por otro lado, se ha realizado un estudio de las etapas avanzadas de degradación enzimática del fibrinógeno, fibrina soluble y estabilizada por la plasmina y la

tripsina, en un medio disociante que ha permitido conocer la aparición de fragmentos no producidos en otras condiciones, lo que aporta un mayor conocimiento de la estructura del fibrinógeno, pudiendo proponer un esquema del mecanismo que posibilita la formación de la fibrina y los sucesivos productos de degradación, no coagulables.

**II.- MATERIALES Y METODOS**

## II.1.- PURIFICACION DEL FIBRINOGENO

La purificación del fibrinógeno bovino se ha realizado por el método de Laki (101), a partir de la fracción de Cohn I con las modificaciones introducidas por Mayo y Rothstein (102), con el fin de eliminar el plasminógeno y otros productos de coagulación.

En los experimentos realizados con fibrinógeno humano se empleó fibrinógeno Kabi, ya purificado, con una coagulabilidad del 95%.

La concentración del fibrinógeno en solución se ha determinado espectroscópicamente a 280 nm usando el coefi-  
ciente de extinción obtenido por Mihalyi (103):  $E_{280}^{0,1\%}$  -  
 $E_{320}^{0,1\%} = 1,506$ , para células de 1 cm de paso de luz.

El grado de pureza de la solución de fibrinógeno se ha determinado midiendo la coagulabilidad con trombina bovina Parke-Davis con una actividad de 5.000 unidades NIH por mg. Para ello se han tenido en cuenta las condiciones óptimas de concentración y pH descritas por Ferry y Morrison (42). La coagulabilidad obtenida fué siempre superior al 95%.

La solución de fibrinógeno en tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, se almacenó en alícuotas de 10 ml a -17°C.

## II.2.- PREPARACION DE FIBRINA

El fibrinógeno se convierte en fibrina mediante la acción de la trombina que separa los fibrinopéptidos "A" y B, a partir de los extremos N-terminales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, como describe Blombäck (104).

Mediante la agregación de varias moléculas de fibrina se llega a formar un polímero intermedio (41), que es una cadena lineal, todavía soluble y cuyo desarrollo se debe a interacciones específicas extremo-extremo. Por último, tiene lugar la agregación lateral de estos polímeros intermedios, dando lugar al coágulo de fibrina.

No obstante, el proceso se puede paralizar en el estado de monómero de fibrina o de polímero intermedio, en presencia de altas concentraciones de hexametilenglicol o urea y especialmente, bajo condiciones muy concretas de pH y fuerza iónica, según describen Shulman y col. (40).

Sin embargo, si la reacción de polimerización de la fibrina se lleva a cabo en presencia de iones calcio y de factor XIII, se producen uniones covalentes entre restos laterales de cadenas peptídicas, ya que son insolubles en ácido o base diluidos y en altas concentraciones de urea, según estudian Robbins (43) y Laki y Lorand (44), respectivamente.

### II.2.1.- Obtención del monómero de fibrina

Para la obtención de fibrina soluble se trató el fibrinógeno humano con trombina en una proporción de 0,1 mg de enzima por 100 de proteína, durante un mínimo de 6 h para que hubiera una separación completa de fibrinopéptidos A y B, según Blombäck y Vestermark (31).

Pasado este tiempo se comprimió el coágulo y se eliminó el líquido sobrenadante. Se lavó varias veces con agua destilada y se redisolvió el coágulo en NaCl 0,15M, urea 3,5M, pH 7,5, que son las condiciones descritas por Shulman y col. (105).

Se eligió NaCl en lugar de un tampón, con el fin de realizar posteriores proteolisis con tripsina en un pH-estato.

La concentración de fibrina fué de 5 mg/ml y se determinó espectroscópicamente, utilizando como coeficiente de extinción el mismo que para fibrinógeno.

### II.2.2.- Obtención de polímero intermedio de fibrina

Se obtuvo el coágulo como ya se ha indicado y a continuación se disolvió NaCl 0,15M, urea 2,35M, pH 7,5.

En estos experimentos, al igual que en los anteriores, la concentración fué de 5 mg de proteína por ml.

### II.2.3.- Obtención de fibrina tramada

Para estabilizar el coágulo de fibrina se añadió al fibrinógeno antes de su coagulación, cisteína y cloruro cálcico, hasta una concentración final de 0,0125 y 0,025M, respectivamente. El factor XIII se hallaba en muy baja proporción junto con el fibrinógeno, pero en suficiente concentración para actuar como catalizador de la reacción. En estos experimentos no se utilizan sales fosfatos, ya que producen un precipitado con la sal de calcio que contaminaría el coágulo de fibrina.

También se estabilizó la fibrina en el estado de polímero intermedio. Para ello se obtuvo fibrinógeno disuelto en NaCl 0,15M, urea 2,35M, pH 6,75, al que se le añadió trombina en la proporción de 0,5 mg de enzima por 100 de proteína. La concentración de fibrinógeno se mantuvo a 5 mg/ml. Transcurrida una hora de la adición de trombina, se añadió cisteína hasta una concentración 0,0125M y cloruro cálcico en una concentración 0,0025M ó 0,025M. Inmediatamente se hizo una nueva adición de trombina en la proporción de 0,1 mg de enzima por 100 de proteína.

El pH se mantuvo en 6,75, ya que Ferry y Morrison (42) comprobaron que las condiciones óptimas de estabilización ocurren a pH comprendidos entre 6 y 7. A continuación se eliminó la cisteína y el  $\text{CaCl}_2$  por diálisis y se

llevó el pH a 7,5. Con el fin de comprobar que se tenían polímeros de fibrina tramada solubles se llevó, por diálisis, a unas condiciones de NaCl 0,15M, urea 3,5M, pH 7,5.

En todos los experimentos se utilizó urea (Carlo Erba) convenientemente purificada y desionizada. Para ello se filtraron por placas de vidrio poroso n° 4, disoluciones acuosas de urea 8M. A continuación se pasaron por una columna de amberlita MB-1 (B.D.H.) de 4x60 cm y, por último, por un filtro Millipore de 0,45  $\mu$  de tamaño de poro.

La concentración y pureza se comprobaron por medidas de conductividades específicas en un conductímetro Philips, siendo la constante de la célula 0,34  $\text{cm}^{-1}$ . Se obtuvieron valores comprendidos entre 0,4 y  $2 \times 10^{-5} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ , una vez eluida la solución de urea por la columna y filtrada por Millipore. Se controló además el índice de refracción en un refractómetro Jena. Se usó como iluminación un foco de luz blanca, obteniéndose un valor de 1,4, que está de acuerdo con los valores obtenidos por Warren y Gordon (106) habiendo utilizado una lámpara de sodio como fuente de iluminación y determinando el índice de refracción a 589 nm.

Por último, se hizo un control de la concentración de cianatos en la solución, ya que pueden interaccionar con los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas, según

tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, con cantidades variables de enzima.

En algunos experimentos ha estado presente el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, procedente de los laboratorios Merck, a una concentración del 5% (p/v).

Las digestiones enzimáticas se han seguido según Mihalyi y col. (92), tomando alícuotas del digerido a tiempos según relación exponencial (1, 2, 4, 8 ... minutos) repetidos en todos los experimentos, independientemente de la relación entre el sustrato y el enzima. Para paralizar la acción de la tripsina, se ha empleado inhibidor de soja en disolución acuosa, en una relación 5:1 (p/p) de inhibidor:enzima. Estos estudios han permitido establecer la relación óptima de proteína-enzima para proseguir nuestros trabajos.

La marcha de la reacción se ha seguido mediante la medida de la densidad óptica a 280 nm a la que se ha restado el escater a 320 nm y que nos da la cantidad de proteína restante, después de retirar el material insoluble o coagulado espontáneamente, por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos, a la temperatura de 4°C.

Los distintos fragmentos formados en la digestión se han identificado mediante electroforesis de zona en gel de poliacrilamida y en presencia de SDS, como se describe posteriormente.

### II.3.2.- Determinación del número de enlaces peptídicos rotos por la acción del enzima

El fibrinógeno o fibrina se preparó en NaCl 0,15M, pH 7,5, a una concentración de proteína de 5 mg/ml. La digestión enzimática se ha realizado en un equipo pH-estado Radiometer, Inc. Copenhagen, Denmark, que consta de un pH-metro 28, una autobureta ABV 12 y un registro tipo SBR 2c conectados a unos electrodos de vidrio siguiendo el método de Mihalyi (110).

Para mantener el pH fijo en 7,5 se utilizó una solución de NaOH valorada en cada caso con ácido benzoico estandar, muestra 39i, procedente del National Bureau of Standards. La solución de NaOH se mantuvo en una botella de polietileno cerrada bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, filtrándose el aire que penetraba a la botella por una pipa conteniendo Soda Asbestos procedente de los laboratorios BDH.

Por este método podemos conocer el número de equivalentes de NaOH gastados por mol de proteína a lo largo del tiempo y, por consiguiente, es posible saber el número de enlaces rotos en la molécula por la acción proteolítica de la tripsina o plasmina usadas. La tripsina se disolvió, como en casos anteriores, en ClH 0,001M. Se emplearon relaciones de sustrato:enzima de 750:1.

El medio de reacción se mantuvo en atmósfera de N<sub>2</sub> húmedo, para evitar acciones extrañas a la proteolisis

que pudieran variar la cantidad de NaOH adicionado, oscilando la temperatura entre 23,5°C y 25°C.

#### II.3.3.- Posterior tratamiento con trombina

El material resultante de tratar el fibrinógeno bovino o humano, con tripsina, se sometió posteriormente a la acción de la trombina. Se empleó una relación de proteína:enzima de 100/1 (p/p) y se prolongó esta acción durante un mínimo de 6 h. a temperatura ambiente. La concentración de material no coagulable se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Posteriormente se estudiaron las distintas entidades moleculares presentes mediante electroforesis de zona.

#### II.3.4.- Tratamiento con calor

Del mismo modo, el material resultante de tratar el fibrinógeno (bovino o humano) con tripsina, se incubó a 57°C durante 30 min. Así se tuvo conocimiento de la cantidad de material termoestable que aparece con el tiempo de incubación con tripsina por medida de la absorbancia a 280 y 320 nm, del material soluble, de las distintas fracciones.

#### II.3.5.- Precipitación con TCA

Igualmente, al material obtenido del tratamiento del fibrinógeno humano con tripsina, se le añadió ácido

tricloroacético hasta una concentración final del 10% (p/v).

Se determinó la cantidad de material soluble por la absorbancia a 280 nm, de las distintas fracciones.

#### II.3.6.- Digestión del fibrinógeno o fibrina con plasmina

La plasmina empleada en estos experimentos procedía de los laboratorios Kabi. Presentaba una actividad de 15 CU/mg según la definición dada por Robbins y Summaria (111).

La enzima se usó en solución acuosa a pH 6,5 y se determinó su concentración empleando el coeficiente de extinción  $E_{280}^{0,1\%} - E_{320}^{0,1\%} = 17,0$ , según Robbins y col. (112), para células de 1 cm de paso de luz.

Se empleó una relación de enzima:sustrato de 5,8834 CU de plasmina por 100 mg de fibrinógeno, según describen Mihalyi y col. (113). La reacción de proteólisis se paralizó mediante la adición de inhibidor de soja, empleando una relación 3/5 (p/p) de inhibidor:enzima.

Todos estos experimentos se realizaron en pH-estato, por lo que el fibrinógeno se mantuvo disuelto en NaCl 0,15M, pH 7,5 y a una concentración de 5 mg/ml. A partir de los datos así obtenidos se pudo determinar el número de enlaces rotos por la plasmina en cada una de las etapas.

## II.4.- PROTEOLISIS DE FIBRINA

Se realizaron proteolisis, tanto de fibrina soluble como tramada, estando la fibrina en estado de monómero o de polímero intermedio y la fibrina tramada como polímero intermedio o como coágulo.

Para todas ellas se siguió el mismo método, a excepción del coágulo de fibrina tramada, que se describe por separado.

### II.4.1.- Fibrina en solución

El material se preparó en NaCl 0,15M, pH 7,5 y urea a la concentración correspondiente, según los casos. La cantidad de material fué de 5 mg de fibrina por ml. Todos estos experimentos de proteolisis se han realizado en pH-estato.

#### II.4.1.1.- Con tripsina

La tripsina se disolvió, como en casos anteriores, en HCl 0,001M. Sin embargo, por la presencia de urea en el medio, su actividad se vió disminuída, correspondiendo a 5.400 unidades BAEE/mg, a las molaridades de urea usadas. Por ello se emplearon relaciones de sustrato:enzima de 500:1 y 1000:1.

La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de N<sub>2</sub> húmedo y a una temperatura de 23,5 - 25°C, en todos los casos.

Como en el caso del fibrinógeno, se sacaron alícuotas de volumen conocido, a tiempos según relación exponencial (92). En ellas se paralizó la acción de la tripsina mediante adición de inhibidor de soja en relación 5:1 (p/p) de inhibidor:enzima.

Se determinó la cantidad de material que conservaba la capacidad de coagular eliminando totalmente la urea presente en el medio por diálisis frente a NaCl 0,15M, pH 7,5. Se cuantificó el material soluble después de diálisis, es decir, sin capacidad de coagular, midiendo la absorbancia a 280 y 320 nm.

Los productos de degradación formados por acción de la tripsina se caracterizaron mediante electroforesis de zona, en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS.

#### II.4.1.2.- Tratamiento con calor

El material resultante de la proteólisis con tripsina, en ausencia de urea, se sometió a una temperatura de 57°C durante 30 min.

Por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 min. se obtuvo el material soluble correspondiente a material termoestable no dializable. Se cuantificó por medida de la absorbancia a 280 y 320 nm.

#### II.4.1.3.- Con plasmina

Con dicho enzima se estudió la proteólisis del monó

mero de fibrina. En estos experimentos se siguió el mismo método y se emplearon las mismas condiciones que en otros casos.

La relación de enzima:sustrato fué igualmente de 1:250 (p/p) y se paró la proteólisis, en cada una de las alícuotas extraídas, con inhibidor de soja en una relación con la plasmina de 3:5 (p/p).

Por la realización de estos experimentos en un equipo pH-estato se conoció el número de enlaces rotos por la plasmina, en cada una de las etapas, y por electroforesis en gel de poliacrilamida se pudieron identificar los fragmentos presentes.

#### II.4.2.- Coágulo de fibrina tramada

Para estos experimentos se partió del material coagulado y estabilizado al que se extrajo el líquido embebido y el material soluble en él. Posteriormente se resuspendió con urea 8M hasta una concentración aproximada de 5 mg proteína/ml, con lo que la fibrina no tramada se solubilizó totalmente ( $\approx 2\%$ ), y a continuación se lavó varias veces con agua destilada.

Para realizar la proteólisis, el coágulo finamente troceado se suspendió en tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8.

##### II.4.2.1.- Digestión con tripsina

Se empleó una relación de proteína:enzima de 100:1

(p/p). Se extrajeron alícuotas a tiempos fijos y, en ellas, se paralizó la proteólisis por adición de inhibidor de soja en relación 5:1 con la tripsina.

#### II.4.2.2.- Digestión con plasmina

En este caso se empleó una relación de proteína:enzima de 80:1 (p/p). Del mismo modo, se extrajeron alícuotas a tiempos fijos. El inhibidor de la reacción enzimática empleado fué también el inhibidor de soja, usado en una relación 3:5 (p/p) con la plasmina.

#### II.5.- ELECTROFORESIS DE ZONA, EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y EN PRESENCIA DE SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica ampliamente usada, ya que con ella es posible obtener una buena separación de una mezcla de proteínas, atendiendo al tamaño o a la carga neta de éstas.

Según Gordon (114) esta capacidad puede deberse a diversas razones:

1°.- Es posible una mayor variedad en el tamaño de poro, dependiendo del contenido de bisacrilamida.

2°.- Los geles de acrilamida poseen una matriz carente de cargas, lo que hace posible separaciones basadas en diferencias de tamaño molecular y movilidad.

Rodbard y col. (115) estudiaron el desplazamiento

de las moléculas, tanto en gradientes lineales como no lineales, llegando a ser posible predecir la velocidad de desplazamiento y posición de cada especie molecular en función del tiempo, voltaje y concentración del gel.

Pitt-Rivers e Impiombato (116) demuestran por equilibrio de diálisis contra agua, que proteínas que no contienen grupos S-S unen aproximadamente 140% de su peso de SDS, mientras que las que tienen grupos S-S sólo unen entre un 90 y un 100%. Por tanto, todas las proteínas con SDS pierden su carga original, adoptando una carga fuertemente negativa. De igual forma, normalmente se elimina el efecto de la diferencia en la conformación y se reduce el efecto de la variabilidad en el volumen específico parcial, hidratación y radio axial (117).

A la vista de lo anterior, proteínas tratadas con SDS y sometidas a electroforesis en geles de concentración constante y con poros suficientemente pequeños migran según una relación lineal entre la movilidad electroforética relativa y el logaritmo de la masa molecular (118). Sin embargo, esta relación no se cumple para masas moleculares muy altas o por debajo de 15.000 (119); pero, la relación lineal se ve aumentada hasta una masa molecular de 2.000, si los geles tienen una concentración 8M de urea (120).

En nuestro laboratorio se realizaron electrofore-

sis de disco en un aparato que es una modificación del modelo empleado por Ornstein (121) y Davis (122), realizado en los talleres del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C.

Para la confección de los geles se usaron productos de gran pureza. Así se usó acrilamida Serva y N-N'-metilen bisacrilamida cristalizada Sigma y TEMED y persulfato amónico de los laboratorios Merck.

Se usaron geles de poro continuo del 5% en acrilamida y con una relación de acrilamida:bisacrilamida de 37:1, preparados con una anticipación máxima de 24 h.

Se siguió el método de preparación usado por Weber y Osborn (123), con algunas pequeñas modificaciones:

1 - Se redujo la cantidad de persulfato amónico en solución a 1 ml, con una concentración de 15 mg/ml.

2 - Se añadieron solamente 25  $\lambda$  de TEMED, para que se efectúe la polimerización.

3 - Para su polimerización no fué necesaria iluminación con lámpara fluorescente, estando completa la polimerización en un tiempo aproximado de 30 minutos.

La electroforesis se realizó en un tampón continuo, ya que tanto los geles como las cubetas electrolíticas contenían tampón fosfatos 0,1M, pH 7,2, 0,1% SDS.

En todos los casos se realizó preelectroforesis con el fin de eliminar los catalizadores y los restos de monó-

mero no polimerizado presentes en los geles (124).

La cantidad de muestra a sembrar osciló entre 25 y 300  $\mu$ g, de acuerdo con Mc Kee y col. (125), en un volumen de 25 a 150  $\mu$ l. Se le añadió igual volumen de tampón fosfatos 0,01M, pH 7,2, 1% SDS y se incubó durante un mínimo de 2 h. a 42°C para favorecer y asegurar la unión del SDS a la proteína (114). Antes de sembrar la muestra se añadió glucosa, para aumentar su densidad evitando la difusión al tampón de la cubeta.

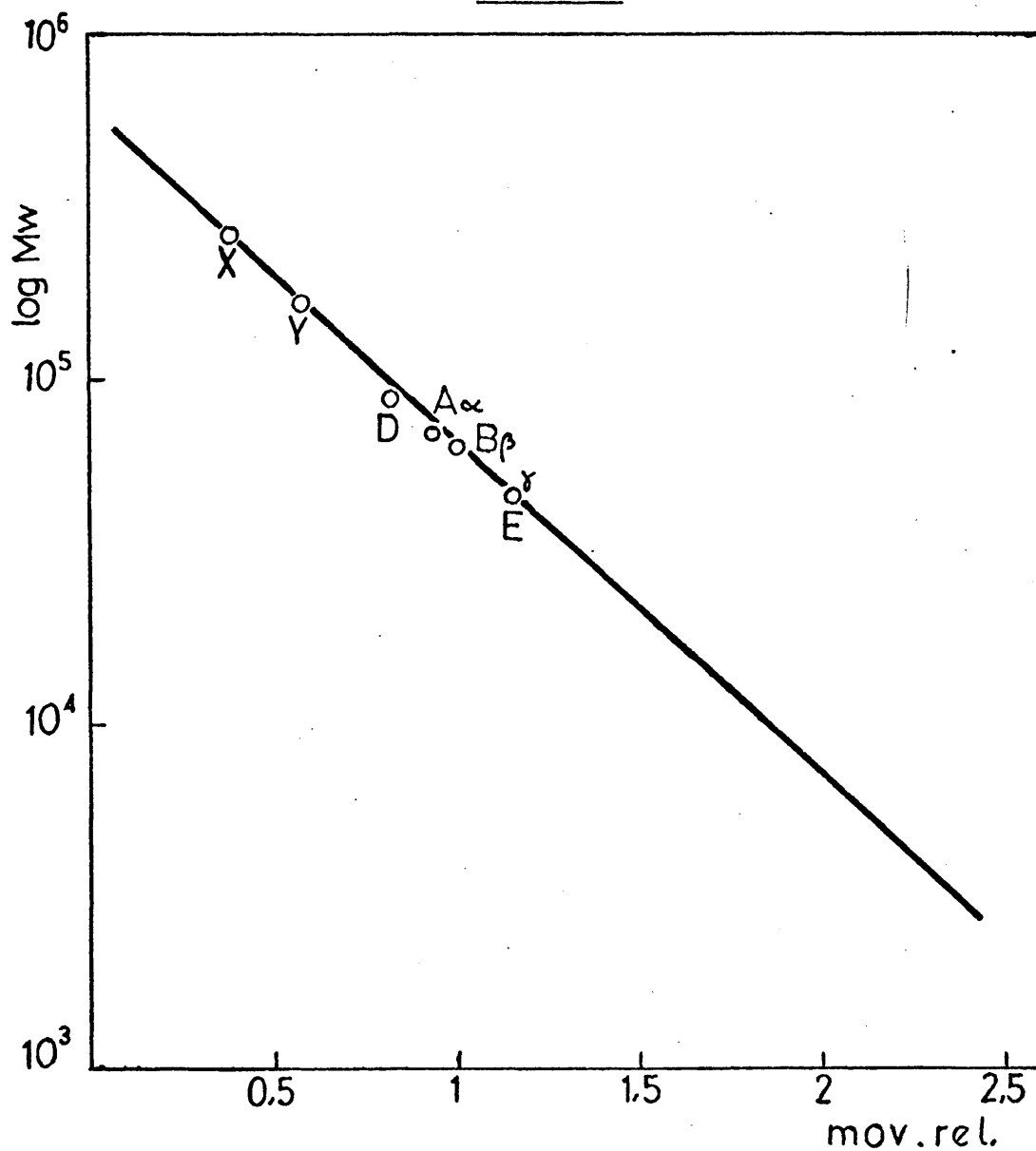
La electroforesis se realizó con una intensidad de corriente constante de 8 mA/gel (6,5 voltios por cm) durante 4 h.

En casi todos los casos se tiñeron los geles con Negro Amido 10B Merck disuelto al 1% en etanol al 20% y ácido acético al 7%, según el método dado por Brummel y Montgomery (126), durante 1 hora. Este colorante tiene la propiedad de ser cuantitativo, ya que el colorante fijado a la proteína es proporcional a ésta.

Sólo en casos en que el material proteico era muy escaso, se tiñeron los geles con Azul de Coomassie que es mucho más sensible (123). Para ello se disolvieron 1,25 g de Coomassie Brilliant Blue Merck en 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético glacial. El tiempo de tinción se prolongó a 2-3 h, según los casos.

El exceso de colorante se ha eliminado de los ge-

FIGURA 1



Relación masas moleculares-movilidad relativa en EGPA en 0,1% SDS (respecto de las cadenas  $B_\beta$ ) para productos de degradación del fibrinógeno con tripsina.

les, mediante sucesivos lavados en una solución de ácido acético glacial al 7,5% y metanol al 5% en agua. Se conservaron en una solución acuosa de ácido acético glacial al 7,5% (115).

Los geles teñidos con negro amido se densitometrar<sub>on</sub>, posteriormente, en un microdensitómetro Joyce Loeb<sub>l</sub> modelo MK III C, de doble rayo. Se obtuvieron gráficas en las que cada banda electroforética está representada por un pico. Podemos conocer la movilidad aparente de cada especie midiendo la distancia entre el máximo del pico correspondiente y el origen, y también la movilidad relativa con relación a ciertas proteínas estandar. Por otro lado, el área de cada pico es, dentro de ciertos límites, proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

A partir de las movilidades relativas se determinaron las masas moleculares de los productos resultantes de la digestión triptica de acuerdo con el método dado por Weber y Osborn (123).

Como estandares se usaron las masas moleculares de los fragmentos tripticos determinados anteriormente en nuestro laboratorio por Albert y col. (98) para fragmentos de fibrinógeno obtenidos por proteólisis con tripsina y que se especifican en la Tabla I, determinados por ultracentrifugación analítica en equilibrio de sedimenta-

TABLA I

Fragmento	Masa molecular
Fibrinógeno	340.000 ± 10%
X	270.000 ± 10%
Y	170.000 ± 10%
D	90.000 ± 10%
E	45.000 ± 10%

ción. Al fragmento E se le asignó una masa molecular de 45.000±10% (figura 1).

## II.6.- ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA

Ya indicamos que en la electroforesis de zona en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, existe un factor limitante en el tamaño de las moléculas, siendo muy difícil trabajar con proteínas de masa molecular superior a  $4 \times 10^5$ . Sin embargo, la ultracentrifugación analítica es una técnica adecuada para la caracterización y fraccionamiento de una mezcla de proteínas de las características moleculares indicadas.

Se ha especificado anteriormente el modo de preparación de monómero de fibrina y de polímeros intermedios, tanto de fibrina tramada como no tramada. Era necesario, sin embargo, caracterizar el material obtenido y el méto-

do más conveniente fué mediante experimentos de velocidad de sedimentación.

#### II.6.1.- Determinación de coeficientes de sedimentación

Todos los experimentos de ultracentrifugación se realizaron en una ultracentrifuga analítica Spinco/Beckman modelo E, con rotor de titanio, en células estandar de aluminio de 12 mm, a 60.000 rpm y a la temperatura de 20°C.

La marcha del experimento se visualizó, en nuestro caso, mediante sistema óptico "schlieren", que mide la variación del índice de refracción con la distancia ( $dn/dx$ ) en cada punto de la célula. Se utilizaron ángulos de cambio de fase de 60, 65 ó 70°. El sistema óptico así dispuesto permite que los frentes de cambio de concentración se fotografien en forma de picos (127). A partir de estas placas fotográficas se puede conocer la velocidad con que una partícula sedimenta en un campo centrífugo dado, observando la posición de los máximos de los picos con el tiempo.

Las placas schlieren se midieron con un microcomparador Nikon (ampliación x10 ó x20). Para cada pico se tomaron un mínimo de 6 posiciones y un máximo de 18, a tiempos medidos.

El valor del coeficiente de sedimentación se obtieu

ne mediante la expresión:

$$s_c = \frac{2,303}{\omega^2} \frac{d \log r}{d t}$$

en donde  $\omega$  es la velocidad angular,  $t$  el tiempo de cada una de las fotografías y  $r$  la distancia del máximo del pico al eje de giro. Representando los valores de  $\log r$  frente al tiempo de sedimentación en minutos, se obtiene una línea recta, cuya pendiente da el valor medio del coeficiente de sedimentación en las distintas posiciones.

Todos estos experimentos se realizaron a una concentración de 5 mg/ml, ya que en el caso de fibrina no tramada, el paso de monómero a polímeros intermedios y coágulo es un proceso dinámico dependiente de factores como pH, fuerza iónica y concentración de fibrina (7). Esta es la razón por la que no se pudo extrapolar a concentración cero en los coeficientes de sedimentación calculados.

## II.7.- REDUCCION DE ENLACES DISULFURO Y CARBOXIMETILACION

El presente trabajo estuvo centrado principalmente en el estudio de los primeros estados de proteólisis con tripsina. Para ello fué importante un mejor conocimiento de los fragmentos de alta masa molecular originados mediante el estudio del tamaño de sus cadenas integrantes y de los aminoácidos  $\text{NH}_2$ -terminales de ellas.

Se trabajó principalmente con los fragmentos con capacidad para coagular espontáneamente producidos por ac

ción de la tripsina, y con los fragmentos X producidos a partir de los anteriores y que han perdido esa capacidad espontánea de coagulación.

Los fragmentos ~~con~~ capacidad de coagulación se aislaron de la mezcla de digestión por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos y a 4°C, después de mantener el material incubado con el enzima en reposo durante un mínimo de 6 horas a una temperatura de 4°C.

Los fragmentos X se aislaron de etapas de proteólisis en las que aún no estaba presente el fragmento Y. Primero se aisló el material con capacidad de coagular espontáneamente y el fibrinógeno restante; a continuación, se sometió el material aún en solución a la acción de la temperatura (57°C) durante 30 minutos. El material coagulado se aisló por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

#### II.7.1.- Reducción de enlaces disulfuro

Para la reducción de los enlaces disulfuro y carboximetilación de estos fragmentos, así como del fibrinógeno y fibrina, se siguió el método dado por Gollwitzer y col. (128).

El fragmento a tratar en cada caso, se disolvió en tampón Tris-HCl 0,08M, pH 8, urea 8M, hasta una concentración de 5 mg de proteína/ml.

Como agente reductor se empleó Ditioeritritol procedente de los laboratorios Sigma. Se añadió en una concentración de 0,02M y se burbujeó N<sub>2</sub> durante unos minutos antes de tapar la mezcla de reacción, que se mantuvo a 37°C durante 6 h y toda la noche a temperatura ambiente.

#### II.7.2.- Carboximetilación

Pasado este tiempo se adicionaron unas gotas de tampón tris-HCl 2M, pH 8, urea 8M, para que se mantuviese el pH durante la carboximetilación realizada con iodoacetato sódico Sigma, en una concentración 0,08M. Se burbujeó N<sub>2</sub> durante unos minutos y se dejó la mezcla reaccionando bajo agitación durante 30 min. En esta parte del proceso se mantuvo el recipiente protegido de la luz, para evitar reoxidaciones.

A continuación, y también protegido de la luz, se dializó el material frente a tampón tris-HCl 0,02M, pH 8, urea 8M, hasta eliminar los reactivos en exceso.

#### II.8.- DANSILACION Y DETERMINACION DE N-TERMINALES

Como ya se indicó, otro de los métodos para una mejor caracterización de los fragmentos producidos en los primeros momentos de la proteólisis del fibrinógeno con tripsina, es el estudio de los aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminales y la comparación de éstos con los del fibrinógeno y fibrina.

### II.8.1.- Dansilación de proteínas

El reactivo cloruro de dansilo (DNS-Cl) cuya fórmula descrita por Gray y Hartley (129) es: 1,dimetilamino-5 sulfonilnaftaleno, procedente de los laboratorios Sigma, reacciona con los grupos aminos primarios, secundarios, fenoles y, en algunos casos, con algún alcohol.

El grupo formado presenta una intensa fluorescencia en el visible (a 510 nm), al ser excitado en el ultravioleta a 365 nm (130). Aunque esta reacción no es específica de los grupos  $\alpha$ -amino, es fácil diferenciarlos de los demás y, sin embargo, la unión entre el dansilo y el grupo amino es enormemente estable y es un método de gran sensibilidad.

Se siguió el método descrito por Gross y Labouesse (130), con algunas modificaciones. El fragmento proteico, tanto completo como separado en sus cadenas, se mantuvo disuelto en tampón tris-HCl 0,02M, pH 8, urea 8M, ya que es necesario que la estructura espacial de la proteína esté desovillada para que se produzca una reacción total.

Se tomó una alícuota de proteína disuelta en la solución indicada y se le hizo reaccionar con el cloruro de dansilo, siendo la relación de proteína:reactivo de 10:1.

El reactivo DNS-Cl (Sigma) se disolvió en 100  $\mu$ l de acetonitrilo al 5,393% (p/v) y a continuación se añadieron 250  $\mu$ l de dimetilformamida, para que no se altere

la velocidad de hidrólisis del cloruro de dansilo, según indica Seiller (131).

El reactivo así preparado se añadió a la proteína, agitando al mismo tiempo. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas.

Pasado este tiempo se precipitó la proteína dansilada por adición de acetona Carlo Erba, en un volumen igual a 3,5 veces el de la disolución de la proteína. El precipitado se separó por centrifugación. Todo lo anterior está de acuerdo con el método seguido por Ayuso (132).

#### II.8.1.1.- Hidrólisis ácida de la proteína

El material tratado según se indica en el apartado anterior, se pasó a una ampolla de vidrio con estrangulamiento; se añadió HCl 6,7N hasta una concentración proteica de 2 mg/ml y 50  $\lambda$  de una disolución acuosa de fenol (4 g/100 ml) para evitar oxidaciones.

Posteriormente se eliminó el aire de la ampolla, congelando la solución y haciendo vacío. Una vez descongelada se volvió a enfriar y se hizo nuevamente vacío. Esta operación se repitió hasta que no se vieron aparecer burbujas en el líquido, al descongelarse.

La hidrólisis se realizó a 110°C durante 5 h. Después de la hidrólisis se colocaron las muestras a temperaturas inferiores a 0°C para paralizar la reacción.

Los hidrolizados se secaron evaporando a vacío a 40°C. La muestra seca se disolvió en metanol, quedando dispuesta para cromatografiar.

#### II.8.2.- Determinación de NH<sub>2</sub>-terminales

La determinación de los DNS-aminoácidos presentes en el material hidrolizado se realizó mediante cromatografía bidimensional en capa fina de poliamida, según el método de Woods y Wang (133). Las placas procedían de la casa Cheng Ching Trading Co. (Taiwan).

El método y materiales usados son los descritos por Ayuso (132).

Como soluciones estandar se usaron:

Solución B : DNS-Ala, DNS-Leu, DNS-Gly, DNS-Asp

" C : DNS-φAla, DNS-Pro, DNS-Leu

" A' : DNS-2NH<sub>2</sub> But, DNS-4NH<sub>2</sub> But

Siendo la denominada solución A la que contenía la muestra.

Se usaron los solventes ya descritos y se les dió el mismo tiempo de desarrollo, siendo:

Disolvente 1 : Amoniaco al 1% en agua destilada -  
45 min.

Disolvente 2 : Fórmico-butanol-heptano, 1:10:10 -  
2 h. 30 min.

Una vez seca la placa, se iluminó con una fuente de

luz ultravioleta Desage Uvis con la que es posible iluminar a 254 y 366 nm sucesiva o simultáneamente.

En general, los aminoácidos dansilados exhiben una mayor fluorescencia al excitarse a 366 nm, pero existen algunos, como la DNS-tirosina, que emiten con coloración naranja y casi únicamente bajo luz de 254 nm.

Con igual técnica se hicieron una serie de cromatogramas con aminoácidos dansilados conocidos, procedentes de Mann Research Lab., New York.

La construcción de estos mapas de DNS-aminoácidos conocidos y la diferente coloración que exhiben algunos permite la identificación de los aminoácidos  $\text{NH}_2$ -terminales.

## II.9.- CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL Y ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE, PERPENDICULAR

Otro modo de conocer los efectos de la acción de la tripsina sobre el fibrinógeno, en los primeros momentos de ataque, es estudiando los fragmentos de baja masa molecular producidos.

Estos fragmentos se obtuvieron por precipitación del material de alta masa molecular de los digeridos, con TCA al 10% (p/v), concentración final y centrifugación de dicho material insoluble.

A continuación se extrajo el TCA de la mezcla con

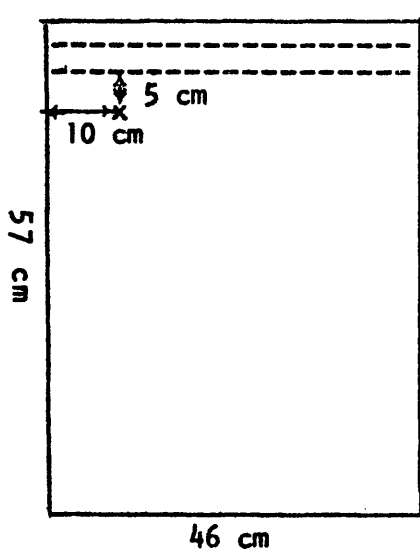
éter, en un extractor líquido-líquido, tipo Palkin, como describe Mihalyi (93). Se hicieron sucesivos cambios del éter hasta que la muestra dió pH neutro.

De esta forma quedó dispuesto el material.

La cromatografía descendente y la electroforesis perpendicular se hicieron según el método dado por Bennett (134). Se usó papel Whatman n° 3 MM, que se lavó con 650 ml de acetato amónico 1M. Se aclaró a continuación con 2 l. de agua destilada. Se dejó secar durante 10 min en estufa a temperaturas inferiores a 80°C y, el resto, a temperatura ambiente.

La cromatografía descendente se hizo en el sentido de mayor dimensión del papel.

La muestra se sembró en un punto que distaba 11,4 cm del extremo, por el lado más largo del papel y 10 cm por el más corto, según se indica en la figura. Se sembró



de 1 a 1,5 mg de muestra, mediante sucesivas aplicaciones seguidas de secado, cuidando que el diámetro de la mancha no excediese de 0,5-0,6 cm. Como marcador de frente se puso una peque-

ña cantidad de rojo fenol.

El papel se introdujo en el tampón por un doblez hecho en el mismo, en su menor dimensión, por encima del punto de aplicación de la muestra y a 2,5 cm del borde. Por otro doblez paralelo al anterior y a 6,4 cm del borde, se apoyó sobre una varilla de vidrio que actuó de antisifón.

El sistema de solvente usado fué: n-butanol-piridina-ácido acético-agua (90:60:18:72) y se desarrolló durante 20 h, a temperatura ambiente y estando la cubeta saturada de humedad. Todos los productos usados fueron procedentes de los laboratorios Carlo Erba.

Terminada la cromatografía, se secó el papel en estufa a 80°C.

Una vez estuvo bien eliminado todo resto de solvente, se realizó la electroforesis de alto voltaje.

El papel se cortó por el doblez realizado a 6,4 cm del extremo, dejando una longitud de 48 cm.

Se empleó un tampón de electroforesis de piridina-ácido acético, pH 3,6 (100 ml ácido acético glacial Carlo Erba+10 ml piridina Carlo Erba diluido hasta 3.000 ml con agua). Con él se humedeció el papel, secando el exceso sin que se extendiese la muestra.

La electroforesis se realizó a 2.000 V, 90-120 mA, a una temperatura de 18-20°C y durante 60 min.

El rojo fenol no interfiere en la electroforesis puesto que migra hacia el ánodo, mientras que todo el material peptídico lo hace hacia el cátodo.

Terminada la electroforesis se secó nuevamente en estufa a 80°C durante 20 minutos.

Cuando estuvo el papel bien seco se humedeció con una mezcla de ninhidrina-collidina-ácido acético-etanol (1 g:80 ml:200 ml:600 ml), siendo todos los productos Carlo Erba.

Se secó en estufa a 80°C durante 5-10 min, apareciendo unas manchas coloreadas en azulado o amarillo.

Se pudo hacer así un estudio de las variaciones ocurridas a lo largo del tiempo, por la acción de la tripsina en los fragmentos de masas moleculares inferiores a 15.000.

III.- RESULTADOS

### III.1.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO BOVINO CON TRIPSINA

Se han realizado digestiones de fibrinógeno bovino a unas relaciones de proteína:enzima de 100:1 y 250:1.

En todos los casos la temperatura de reacción, se mantuvo entre 23,5 y 25°C, durante todo el experimento.

#### III.1.1.- Estudios cinéticos

A partir de las medidas de absorbancia del material soluble de cada una de las alícuotas extraídas a distintos tiempos de la mezcla de digestión, se pudo obtener el porcentaje de proteína insolubilizada por la tripsina en cada etapa.

Se observó una disminución del material soluble en los momentos iniciales de digestión (entre 1 y 2 minutos), dependiendo de la relación proteína:enzima. Este proceso se corresponde con la formación espontánea de un coágulo de aspecto consistente que incluye alrededor de un 9% de fibrinógeno incubado. A partir de este momento de la proteólisis, la cantidad de material soluble va en aumento rápidamente y el coágulo formado no sólo disminuye en tamaño, sino que paralelamente su aspecto se hace

menos compacto y más fácilmente disgregable por acción mecánica. Por último se llega a un estado en que prácticamente todo el material es soluble de un modo permanente.

Todos estos resultados se pueden visualizar en la figura 2.I, donde se ha representado la cantidad de proteína coagulada por la tripsina en función del tiempo, para un experimento realizado con una proporción de fibrinógeno:tripsina de 100:1.

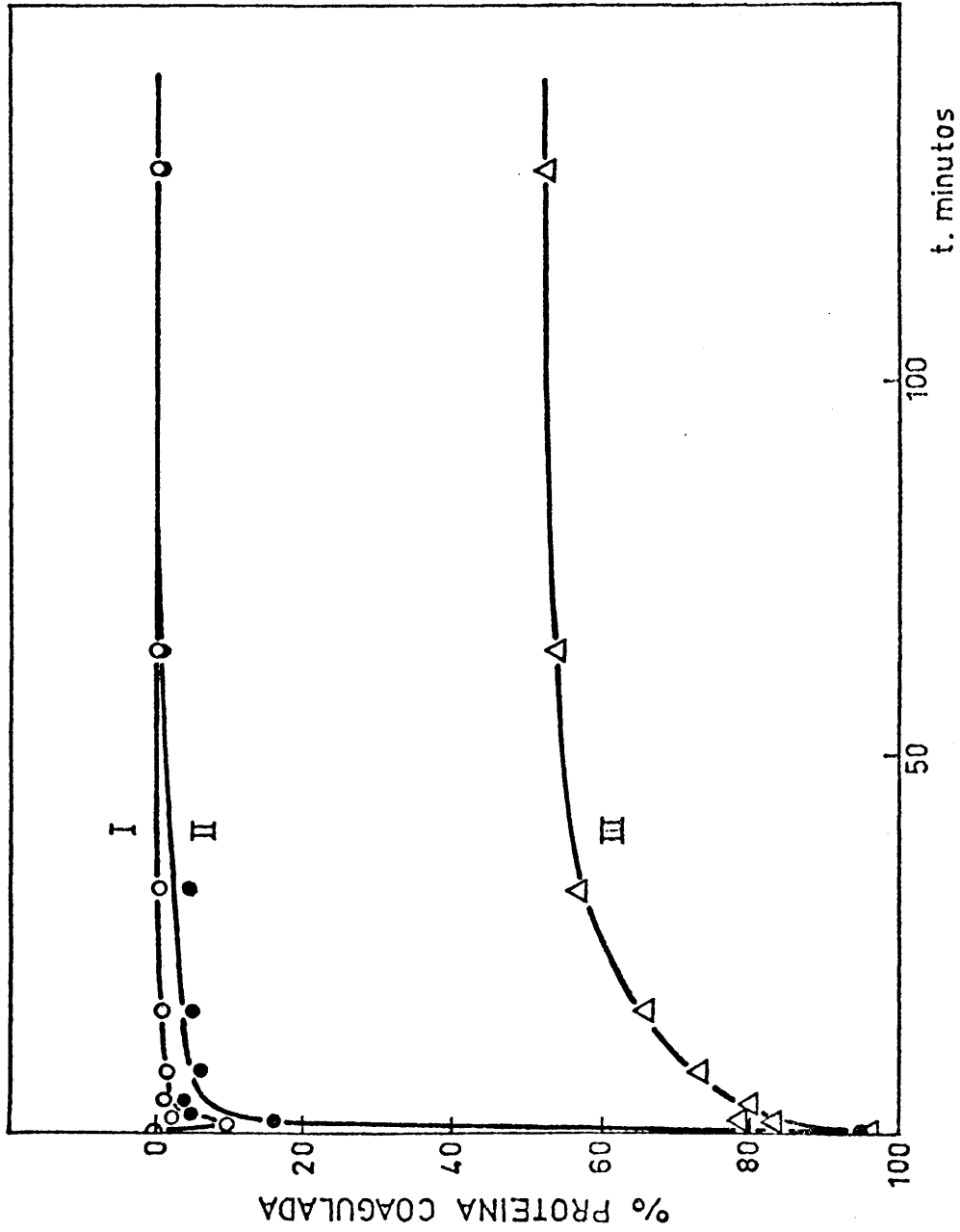
No se observa una clara diferencia en las proporciones coaguladas por tripsina cuando se emplea una proporción menor de enzima, ya que en las condiciones estudiadas se obtienen unos valores de 9,8 y 8% respectivamente a 100:1 y 250:1.

La electroforesis de cada una de las etapas de proteólisis proporcionó información complementaria a los datos obtenidos.

En los densitogramas de la figura 3 se observa que en las muestras de las etapas de proteólisis correspondientes al mínimo de solubilidad existían moléculas de fibrinógeno intactas y una gama muy amplia de fragmentos de alta masa molecular que habría que incluir dentro de los denominados fragmentos X (curva a).

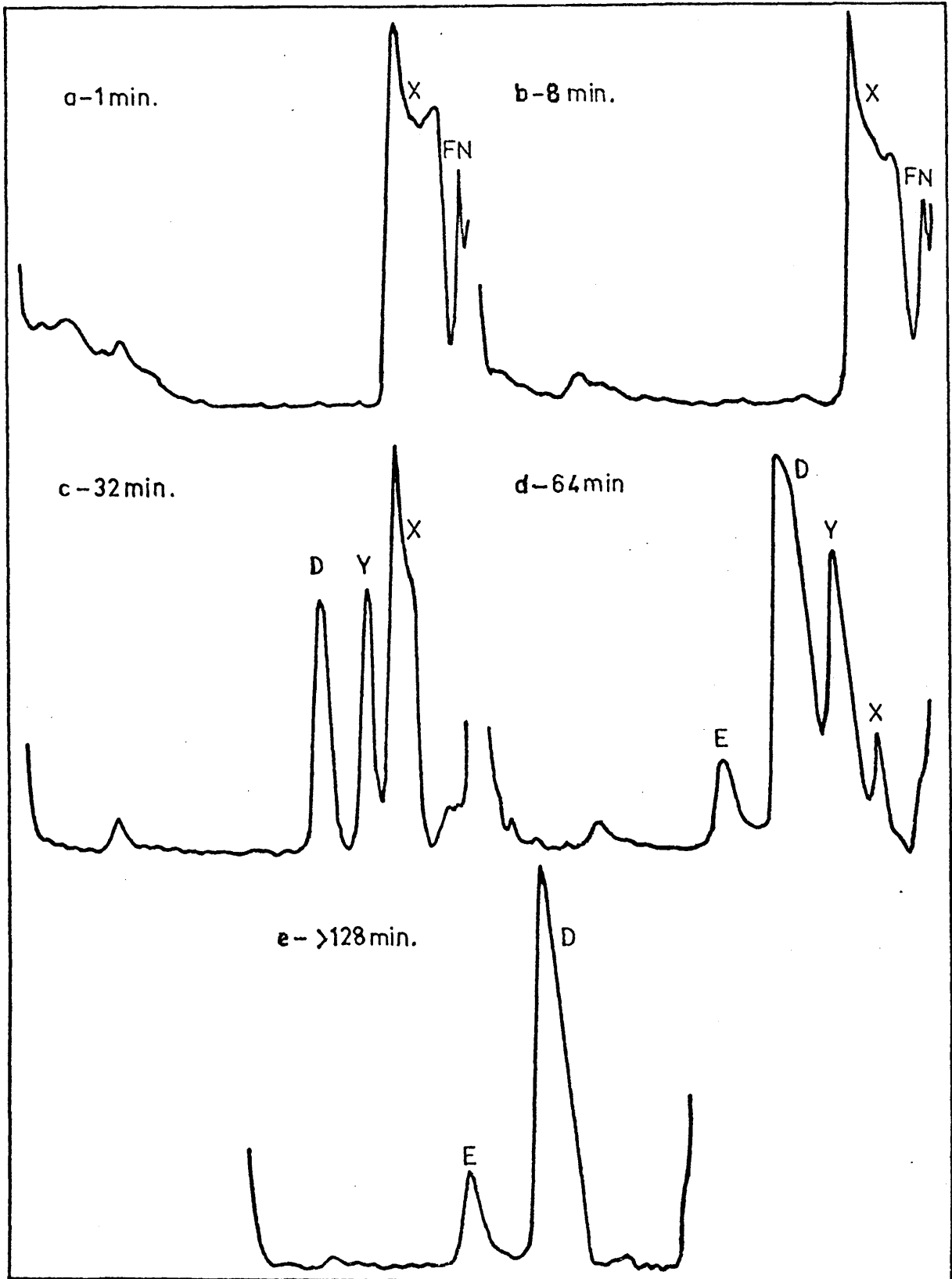
A medida que avanza el tiempo de proteólisis en las etapas correspondientes al tramo de curva de elevada pendiente positiva, la proporción de fibrinógeno intacto dis

FIGURA 2



I.- Proteolisis de fibrin6geno bovino:tripsina=100:1. II.- Tratamiento adicional con trombina del material soluble. III.- Incubaci6n a 57°C, 30 min.

FIGURA 3



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno bovino con tripsina (relación 250:1) a distintos tiempos de incubación.

minuye y los fragmentos X de mayor masa molecular se van transformando en fragmentos X de mayor movilidad (curva b).

Por último, en las etapas incluidas en la parte asintótica de la gráfica, se hacen presentes, de modo sucesivo, los fragmentos Y, D y E (curvas c y d), llegándose por fin a un estado en que sólo aparecen fragmentos D y E en una proporción constante (curva e).

### III.1.2.- Material coagulable por trombina

Cada una de las etapas de la digestión de fibrinógeno bovino por tripsina se sometieron a continuación a la acción de la trombina, con el fin de estudiar los efectos de este segundo enzima sobre los fragmentos obtenidos. Un conocimiento más exacto de sus efectos se tuvo por medida de la absorción, en la región del U.V., del material soluble restante.

Para tiempo cero de acción con la tripsina queda , tras el tratamiento con trombina, un  $5 \pm 0,5\%$  del material inicial en solución, para todos los experimentos.

El avance de la acción proteolítica de la tripsina lleva emparejada una disminución de la capacidad de coagular por acción de la trombina de los fragmentos originados, hasta llegar al tramo asintótico de la curva correspondiente a la acción de la tripsina, en que el material en solución no es coagulable, como puede verse en la figu

ra 2, curva II.

Los estudios por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 4) ponen de manifiesto que la acción de la trombina hace coagular lo que queda del fibrinógeno intacto, como era de esperar, existiendo una clara selectividad sobre los fragmentos X de baja movilidad, que desaparecen por completo de la fracción soluble, como se ve comparando el densitograma b con el b'.

Sin embargo, permanecieron los fragmentos X de mayor movilidad, al igual que los fragmentos Y, D y E.

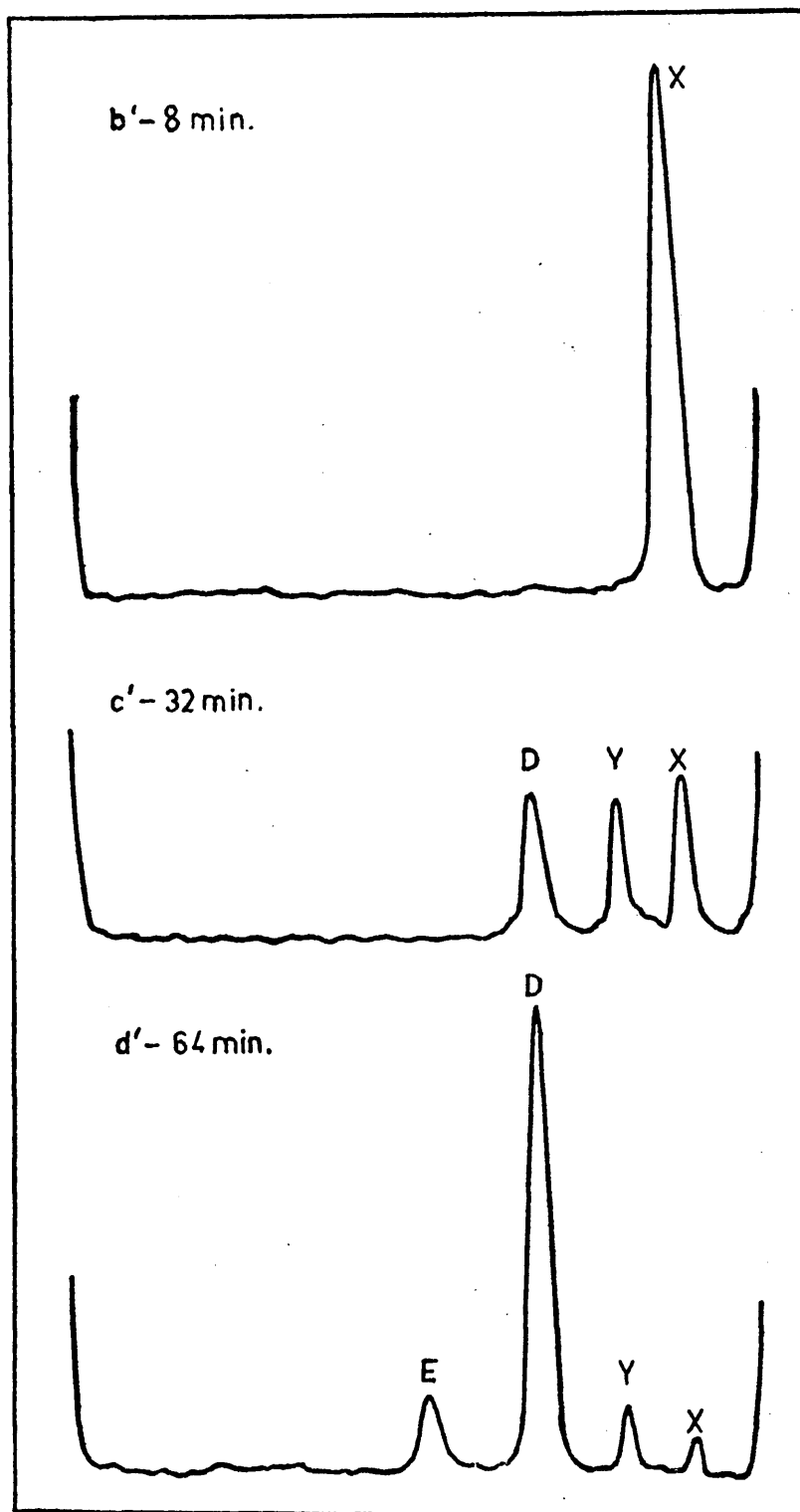
### III.1.3.- Material coagulable por acción de la temperatura

Por último, material tratado con tripsina a diferentes tiempos se sometió a una temperatura de 57°C durante 30 min, con lo que se consiguió la coagulación de los fragmentos de masa molecular superior a 60.000 (135).

Se observa que incluso en las primeras etapas, correspondientes al máximo de coagulación por acción de la tripsina, se lograron unos niveles del  $5 \pm 0,5\%$  de material soluble que coincide precisamente con el material no coagulado por la trombina.

La cantidad de material termosoluble sigue aumentando rápidamente hasta alcanzar un valor casi estable de un  $47 \pm 1\%$ , como puede verse en la figura 2, curva III. Esta situación corresponde a la presencia de fragmentos E y

FIGURA 4



Perfiles electroforéticos de los productos solubles resultantes de proteólisis de fibrinógeno con tripsina (250:1), seguida de incubación con trombina.

otros de menor masa molecular, exclusivamente.

### III.2.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO BOVINO CON TRIPSINA EN PRESENCIA DE ACIDO $\epsilon$ -AMINOCAPROICO

Se hicieron estudios a diferentes tiempos de incu  
bación del fibrinógeno con tripsina para relaciones varia  
bles dadas de sustrato:enzima. Así se realizaron experi-  
mentos en las relaciones 40:1, 70:1. 250:1 y 500:1 de fi-  
brinógeno:tripsina.

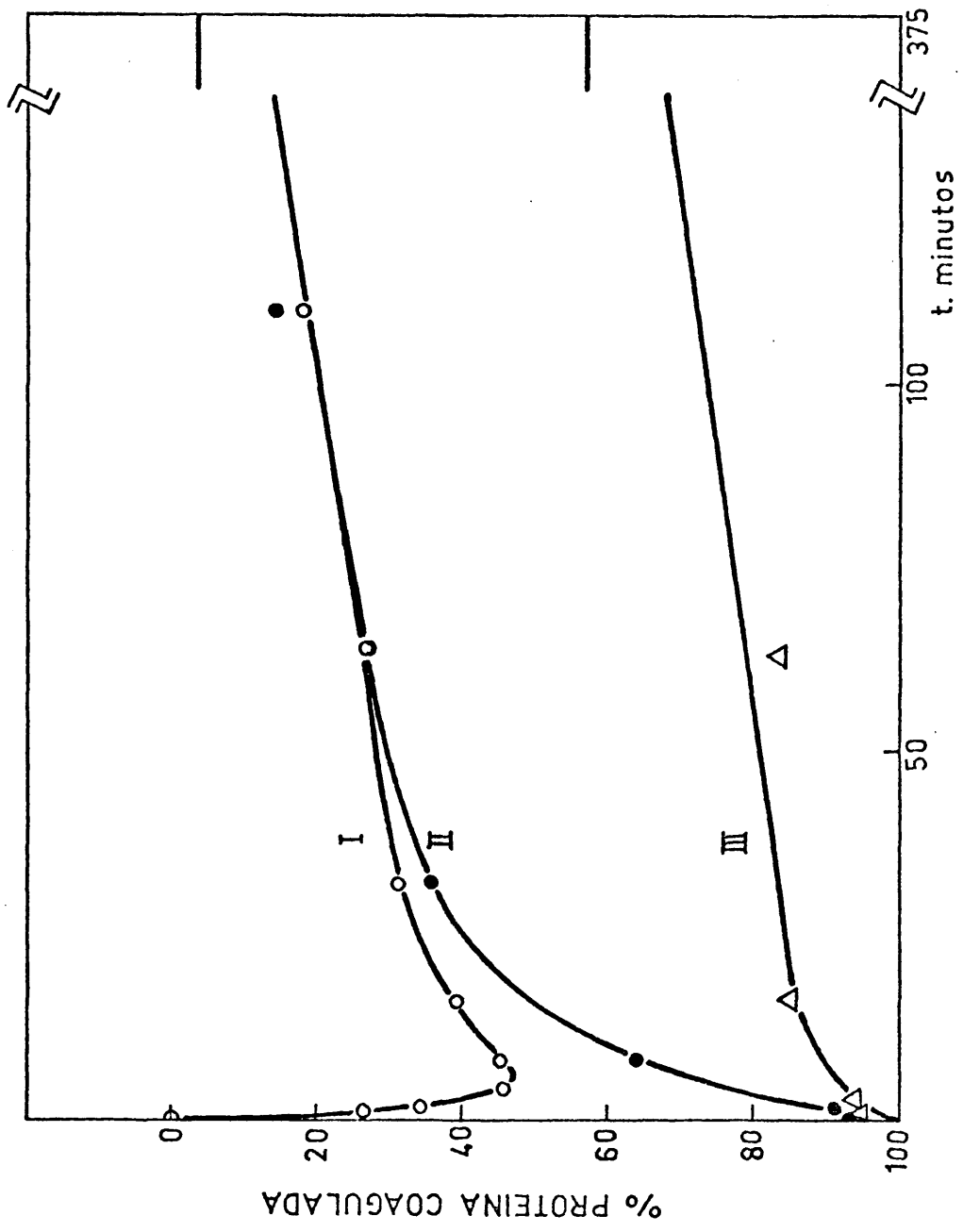
Todos ellos se realizaron a una temperatura de  
23,5 - 25°C y en presencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico al 5%  
(p/v), que es un conocido inhibidor competitivo de la  
tripsina (136), con el fin de seguir con mayor facilidad  
las etapas iniciales.

#### III.2.1.- Estudios cinéticos

Por medidas de absorción de la fracción soluble pa-  
ra cada tiempo de incubación se observa un comportamiento  
del mismo tipo que en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico ,  
como se ve comparando las figuras 2 y 5. Aunque es eviden-  
te una mayor proporción de material coagulado y una asime-  
tría del mínimo de solubilidad por acción enzimática que  
indica que la velocidad de formación de material insolu-  
ble es mucho mayor que la de redisolución por la continui-  
dad de la proteolisis (figura 5.I).

La situación de material soluble mínimo se alcanzó

FIGURA 5



I.- Proteolisis de fibrinogeno bovino:tripsina=250:1, en presencia de  $\epsilon$ -ACA 5%. II.- Trata-  
miento adicional con trombina del material soluble. III.- Incubación a 57°C, 30 min.

entre los 1 y 6 minutos iniciales de incubación, dependiendo de la relación de fibrinógeno:enzima usada.

La cantidad máxima de material coagulado por la tripsina para cada una de las relaciones empleadas, viene especificada en la tabla II.

TABLA II

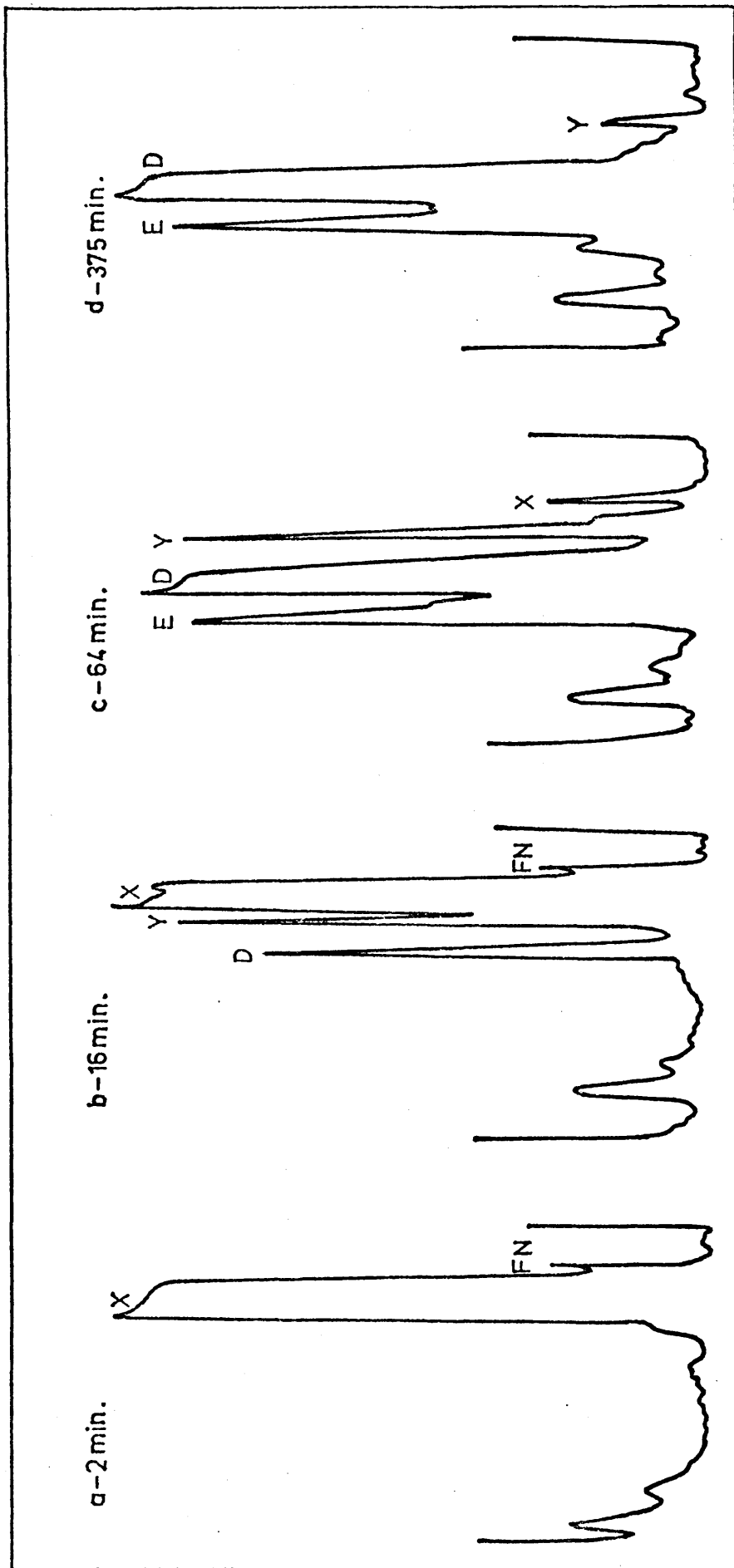
Coagulación de fibrinógeno bovino por acción de la tripsina, en presencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (5% p/v)

Relación FN:T	% material coagulado máximo	Tiempo (min.)
500:1	43	-
250:1	46	4-8
70:1	72	2
40:1	11	1

La proporción de material coagulado es considerable, sobrepasando el 50% del material coagulable por trombina. Se observa un valor más alto a una relación determinada: 70:1, lo que sugiere, como cabría esperar, la presencia de dos procesos de velocidades distintas que compiten. Por una parte, la formación de fibrina insoluble y, por otra, la de productos de alta masa molecular solubles.

Se comprueba por electroforesis de zona en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (figura 6) que los dis

FIGURA 6



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno bovino con tripsina (relación 250:1) en presencia de  $\epsilon$ -ACA al 5% (p/v).

tintos fragmentos presentes en las diferentes etapas de proteólisis son comparables a los obtenidos en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproíco.

Además, dichos fragmentos aparecen en etapas correspondientes a las de anteriores experimentos, como se ve comparando las figuras 2 y 3 con las 5 y 6.

### III.2.2.- Material coagulable por trombina

Como puede verse en la figura 5 curva II, el material inicial era de una coagulabilidad del  $95 \pm 0,5\%$ . Sin embargo, al aumentar el tiempo de la incubación, la coagulabilidad de las muestras con trombina se aproxima a la conseguida con tripsina y se llega a una situación en la cual todo el material susceptible de coagular, lo ha sido por la tripsina.

### III.2.3.- Material coagulable por acción de la temperatura

Con este tratamiento se obtienen resultados semejantes a los conseguidos en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproíco, como se ve comparando las figuras 2 curva III y 5 curva III, con la diferencia de que para alcanzar el valor límite de alrededor de un  $45\%$ , se necesitan tiempos mucho mayores.

### III.3.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO HUMANO CON TRIPSINA Y PLASMINA

A partir de estudios previos de proteolisis sobre fibrinógeno bovino se pasó a trabajar con material de procedencia humana, dado el mayor interés en relación con su aplicación clínica directa.

Se hizo un estudio comparativo de los efectos producidos por la tripsina y la plasmina sobre un mismo sustrato, fibrinógeno o fibrina, según los casos.

#### III.3.1.- Estudios cinéticos con tripsina

Se usaron las relaciones de enzima:sustrato de 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000, lo que nos permitió no sólo conocer las distintas etapas de degradación del fibrinógeno humano a lo largo del tiempo, sino también las condiciones más favorables bajo las que se puede pasar de la etapa insoluble de la fibrina a los distintos FDP o productos de degradación del fibrinógeno solubles.

Todos estos estudios se llevaron a cabo a una temperatura comprendida entre 23,5 y 25°C, incluso los realizados en pH-estato.

Como en casos anteriores, la primera determinación que se llevó a cabo fué la cantidad de material soluble restante en cada una de las etapas después del tratamien-

to con tripsina.

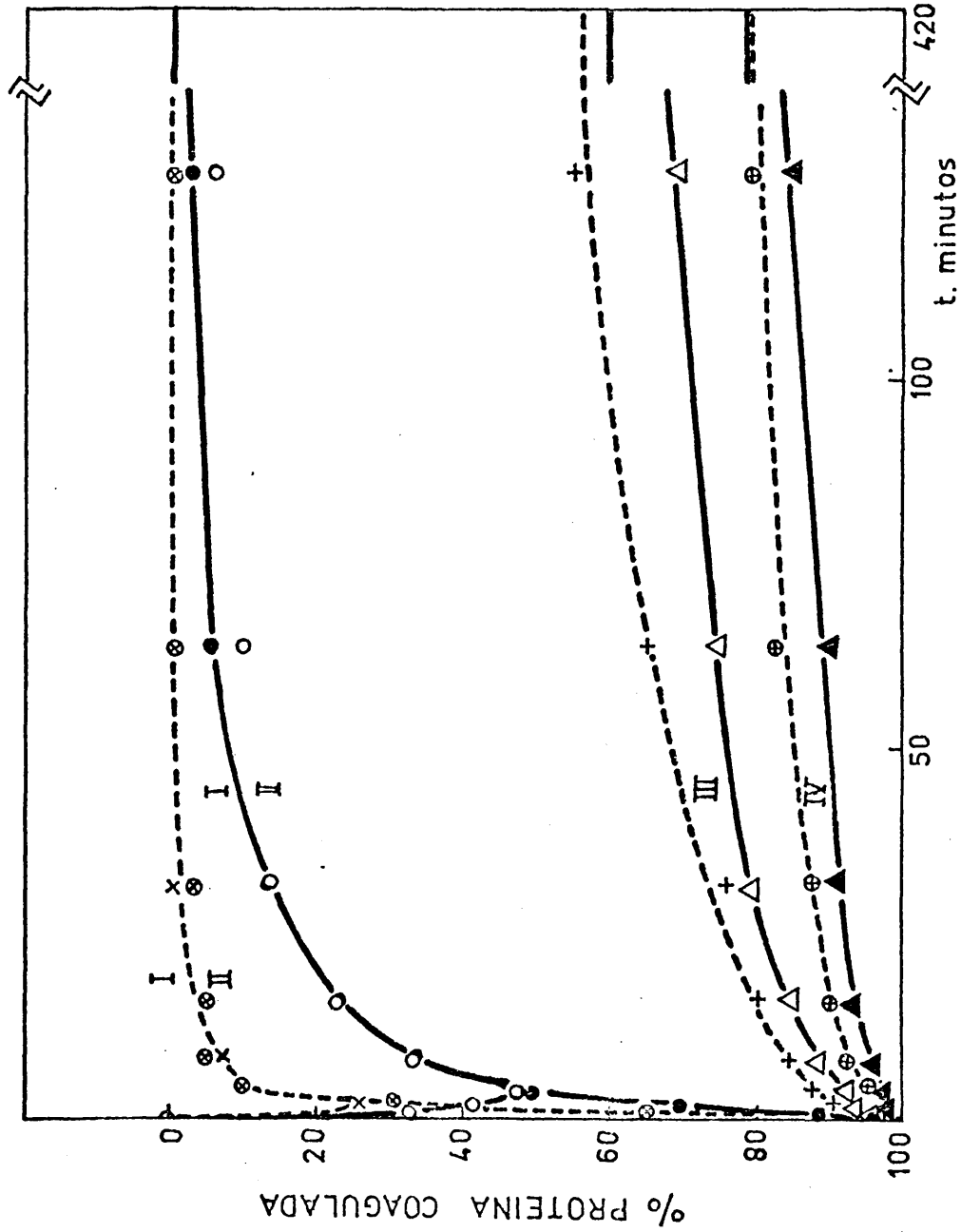
También se obtiene para estos experimentos un perfil que podría dividirse en 3 regiones, como puede verse en la figura 7, curva I: Un primer tramo de elevada pendiente negativa en la que aumenta el material insoluble con el tiempo de proteólisis, una segunda zona de pendiente positiva menos brusca que la primera, en la que comienza la solubilización del fibrinógeno coagulado, y una tercera de estabilización, de crecimiento asintótico hacia el 100% de material soluble inicial.

Sin embargo, con relaciones muy pequeñas de enzima, como en la relación 2000:1 y en la 4000:1, el primer tramo se ve, a su vez, claramente dividido en dos etapas, como puede apreciarse en la figura 8, curva I. Una primera parte con una gran velocidad de reacción y, tras una pequeña meseta, un segundo proceso de menor pendiente, aunque también negativa. Este último lleva emparejado en todos los casos un aumento en la resistencia del coágulo formado, con relación a las primeras etapas.

Atendiendo a la cantidad de material coagulado en la etapa más favorable de cada una de las cinéticas, se obtuvieron los resultados reflejados en la tabla III.

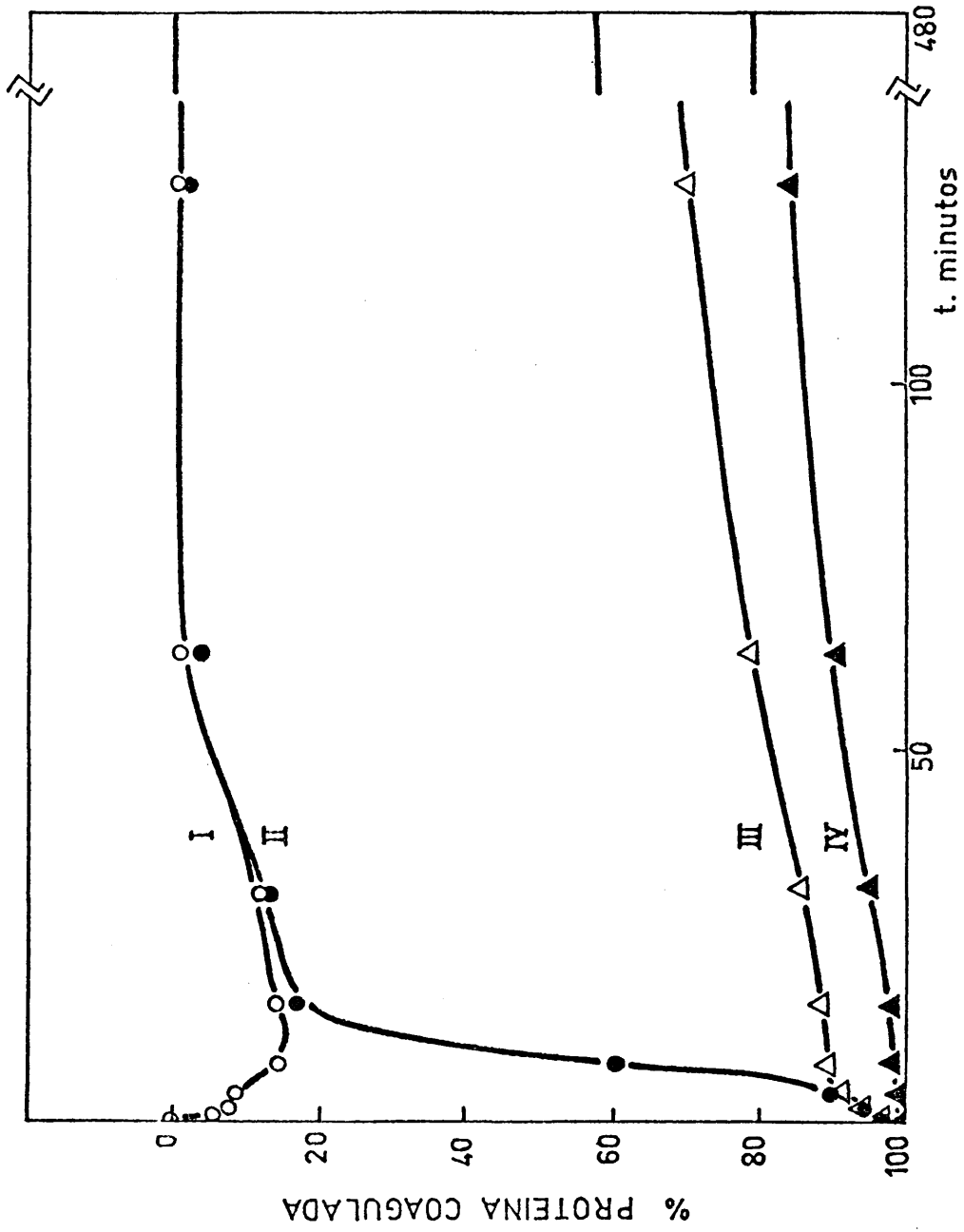
Como puede verse la cantidad de material coagulado por acción proteolítica de la tripsina, en la situación más favorable, varía al hacerlo la proporción de tripsina

FIGURA 7



I.- Proteólisis de fibrinógeno humano:tripsina (—relación 1000:1; --- relación 500:1).  
II.- Tratamiento adicional con trombina del material soluble. III.- Incubación a 57°C,  
30 min. IV.- Precipitación con TCA al 10%.

FIGURA 8



I.- Proteolisis de fibrinogeno humano:tripsina=2000:1. II.- Tratamiento adicional con trombina del material soluble. III.- Incubación a 57°C, 30 min. IV.- Precipitación con TCA al 10%.

TABLA III

Coagulación de fibrinógeno humano por acción de la tripsina

Relación FN:T	Valor máximo de material coagulado	Tiempo (min.)
100:1	11 %	1
250:1	12 %	1
500:1	25 %	2
1000:1	47 %	4
2000:1	14 %	8
4000:1	18 %	32

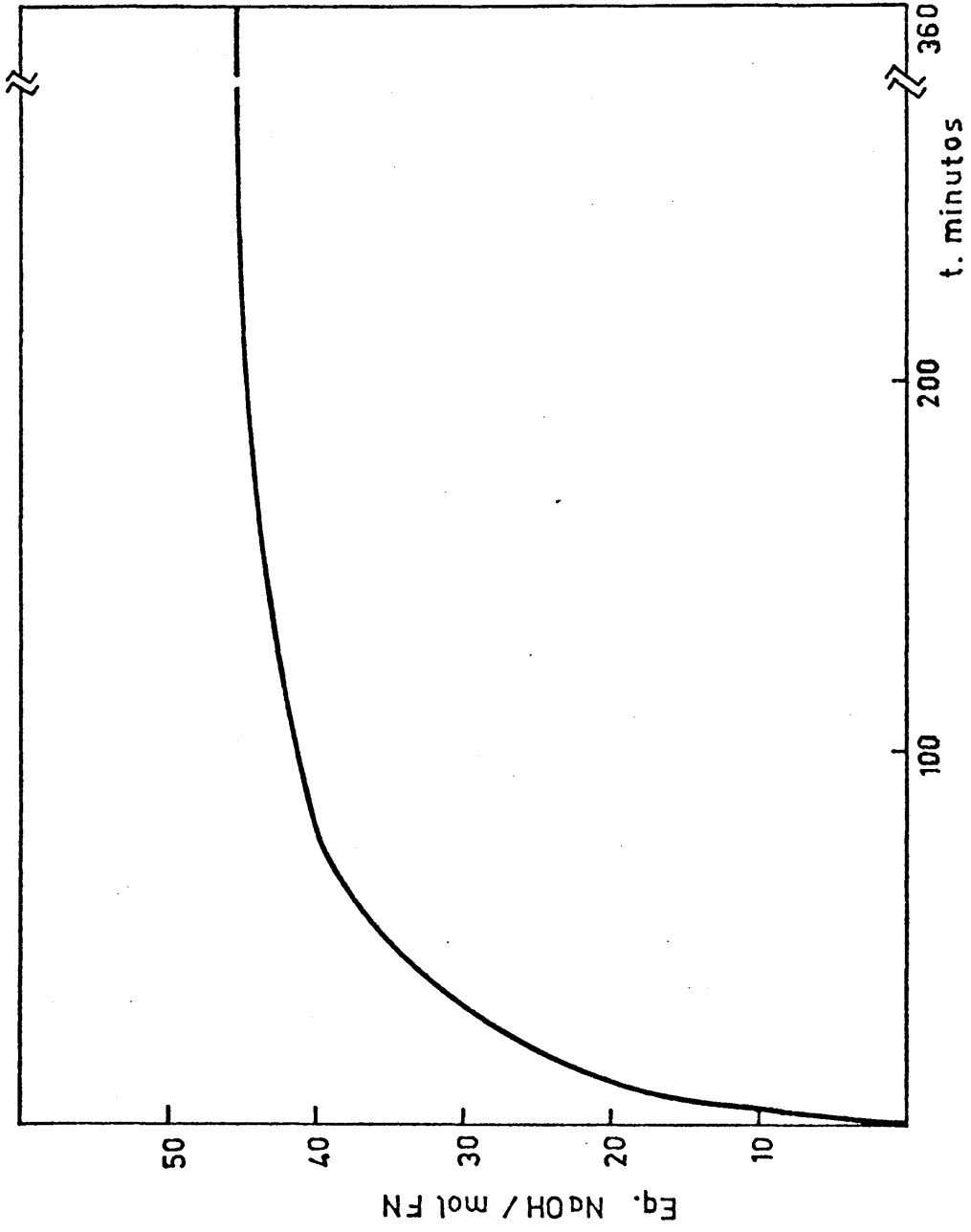
presente en el medio de reacción, existiendo una relación 1000:1, que parece ser la óptima, como ocurre con el fibrinógeno bovino. Sin embargo, esta relación es claramente distinta a la obtenida en aquel caso.

Para la determinación del número de enlaces rotos durante la digestión enzimática con tripsina, se empleó un pH-estato, como se ha descrito anteriormente.

La relación de fibrinógeno:tripsina empleada fué de 500:1, estando el fibrinógeno a una concentración de 5 mg/ml.

Convirtiendo los resultados experimentales a equivalentes de NaOH por mol de fibrinógeno para cada tiempo, se obtuvo la gráfica representada en la figura 9. Por es-

FIGURA 9



Equivalentes de NaOH por mol de proteína, consumidos en la proteólisis de fibrinógeno humano con tripsina (relación 500:1).

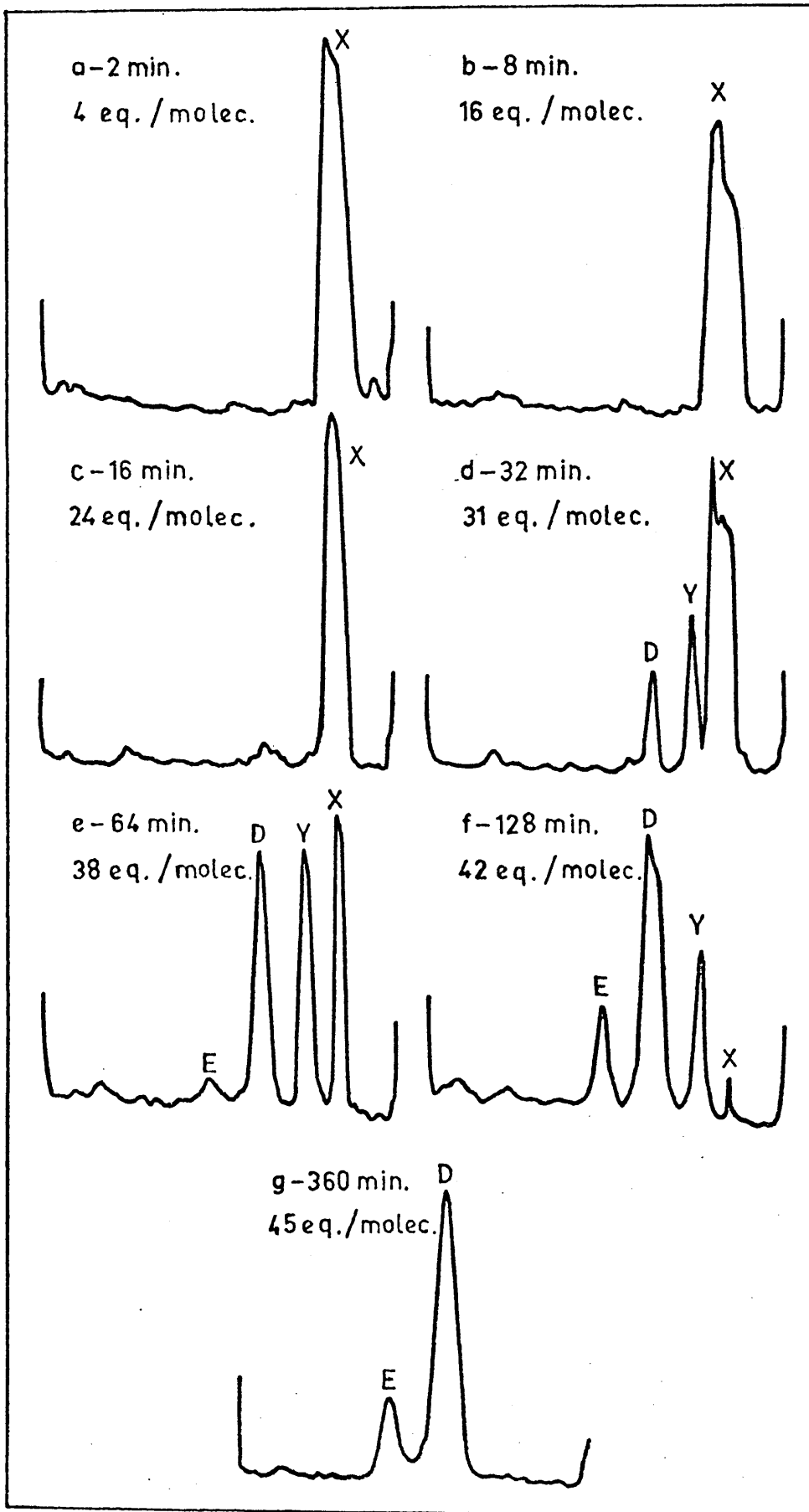
tos datos se puede conocer el número de enlaces peptídicos rotos por el enzima por mol de fibrinógeno en cada instante. Se comprueba que en los primeros momentos de ataque por la tripsina, el número de enlaces rotos es grande, correspondiendo a la etapa de máxima coagulación por tripsina, un valor de 4-5 enlaces rotos por molécula de fibrinógeno.

El valor final obtenido fué de 46 enlaces peptídicos rotos por mol de fibrinógeno inicial.

Como puede verse en la figura 10, por electroforesis de cada una de las etapas de proteólisis, se comprueba que están presentes las especies moleculares que se especifican en la tabla IV, además de otras de menor tamaño molecular (<15.000 Dalton). Todas las masas moleculares determinadas por EGPA en la presente Memoria tienen un error estimado de  $\pm 10\%$ . En los distintos densitogramas, además del tiempo de incubación con tripsina figura el número de enlaces peptídicos cortados por molécula de fibrinógeno original de la muestra. Se observa que antes de que aparezcan los fragmentos Y se han roto un número superior a 24 enlaces por molécula.

No obstante, al ser un proceso dinámico, la aparición y desaparición de los distintos fragmentos fué paulatina, siguiendo el sentido descendente de la tabla.

FIGURA 10



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno humano con tripsina (relación 500:1).

TABLA IV

Fase de proteolisis	Especie molecular	Masa molecular	
De formación de material coagulable	Trazas fibrinógeno	340.000	
	Amplia gama X	300.000-250.000	
De pérdida de material coagulado	X de mayor movilidad	270.000-210.000	
	Aparición de Y	170.000	
De estabilización del material soluble	X de mayor movilidad	260.000	
	Y	170.000	
	D	temprano	100.000
		tardío	80.000
	E	46.000	

### III.3.2.- Material coagulable por trombina

Como puede verse en la figura 7 curva II, una vez alcanzado el máximo de coagulación con tripsina, el material soluble no contiene especies coagulables por trombina, por lo que las curvas I y II se superponen a diferencia de la que se observa en el caso del fibrinógeno bovino. Este fenómeno se cumple en todos los casos estudiados para relaciones inferiores a 1000:1.

Sin embargo, según se observa en la figura 8 curva II, para las proteolisis con relaciones 2000:1 y 4000:1 de proteína:enzima pueden verse, mediante medidas de absorción del material soluble, dos fases para la etapa comprendida entre el comienzo de la digestión enzimática y el

punto de máxima coagulación de material por acción de la tripsina.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 11) se observa que el material coagulado por acción de la trombina es exclusivamente el fibrinógeno intacto y los fragmentos X de más elevada masa molecular, mientras que permanecen por no ser coagulables los fragmentos X de mayor movilidad, al igual que los Y, D y E y fragmentos peptídicos más pequeños.

### III.3.3.- Material coagulable por acción de la temperatura

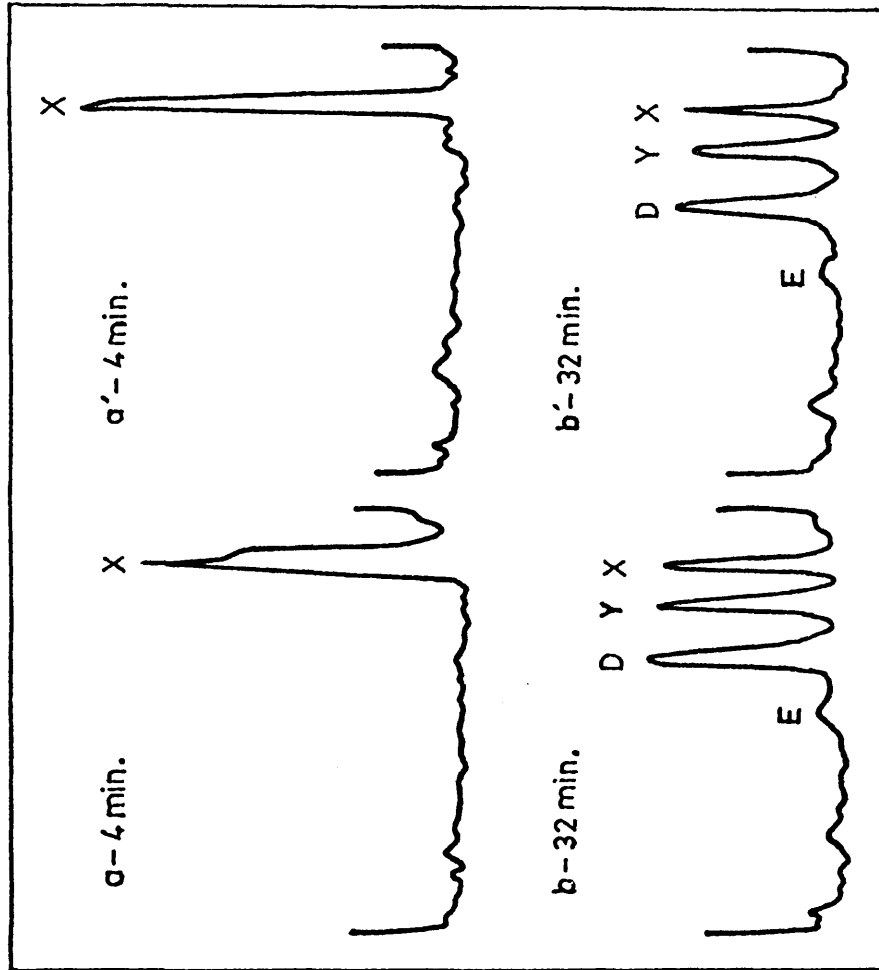
Como se ve en las figuras 7 y 8 curva III, ya desde los momentos iniciales de proteólisis está presente una cierta cantidad de material termoestable capaz de ser detectado en el U.V., no superior a un 7% y dependiente, en proporción directa, de la cantidad de tripsina presente en el medio de reacción.

En el estado de digestión enzimática en que los únicos fragmentos de elevada masa molecular son los D y E, la cantidad de material termoestable es del 48-49%.

### III.3.4.- Material soluble en TCA al 10%

Determinando el material soluble en TCA al 10% se puede tener conocimiento del material peptídico de masa molecular inferior a 15.000-16.000 (93) que es capaz de ser detectado mediante medidas de absorción a 280 nm.

FIGURA 11



a y b: Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno humano con tripsina (100:1). a' y b': Perfiles electroforéticos de los productos solubles después del tratamiento con trombina.

Como se ve en las figuras 7 y 8 curva I', la cantidad de material es siempre inferior a la de material termoestable a 57°C, llegando a un 21-22% del material inicial durante las últimas etapas de proteólisis estudiadas en este trabajo.

### III.3.5.- Estudios cinéticos con plasmina

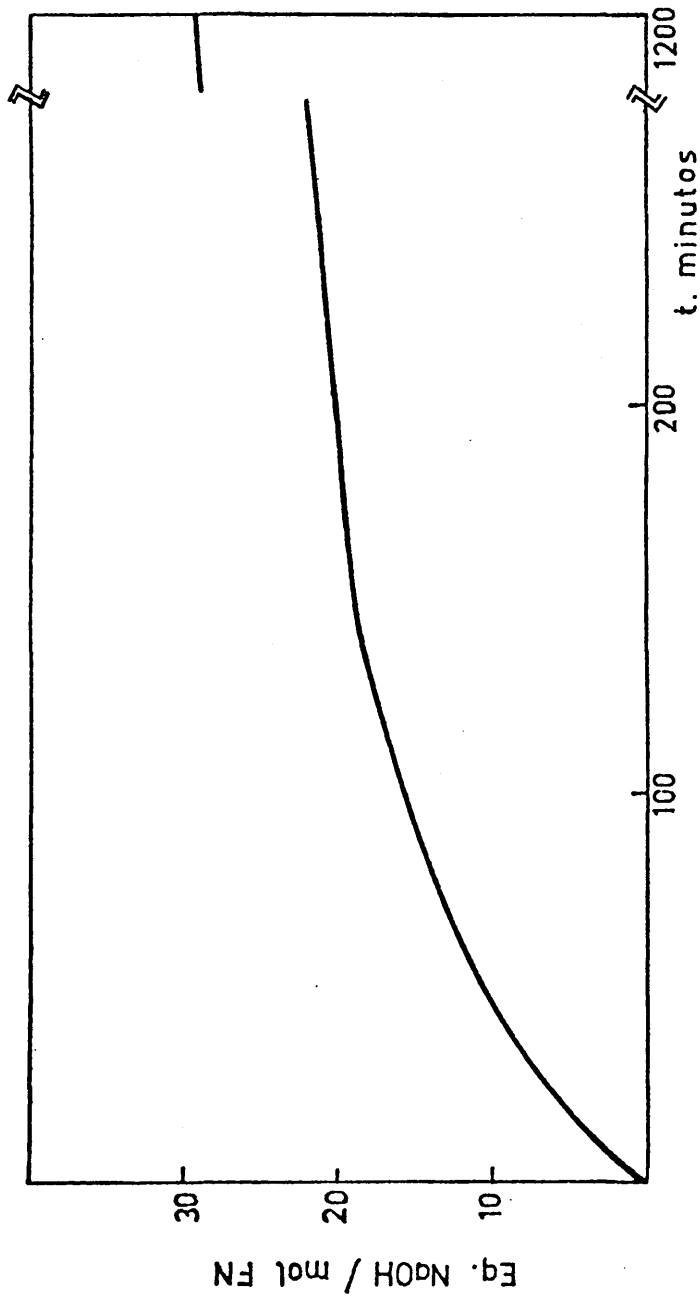
Se realizó un estudio en pH-estato a una temperatura de 23,5-25°C y con unas relaciones de fibrinógeno:plasmina de 250:1 y 150:1 (p/p).

Como puede verse en la figura 12, se produce una rotura de enlaces peptídicos mucho más lenta que la observada con la tripsina, además de no presentar un aumento rápido del número de enlaces cortados hasta alcanzar un valor prácticamente constante. En este caso, incluso después de los 200 primeros minutos prosigue, aunque más lentamente, la ruptura de enlaces hasta alcanzar el valor de 29 equivalentes de NaOH por mol de fibrinógeno a las 20 horas de proteólisis.

En la figura 13 se muestran los densitogramas correspondientes a la electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) de distintas muestras incubadas con plasmina durante tiempos crecientes.

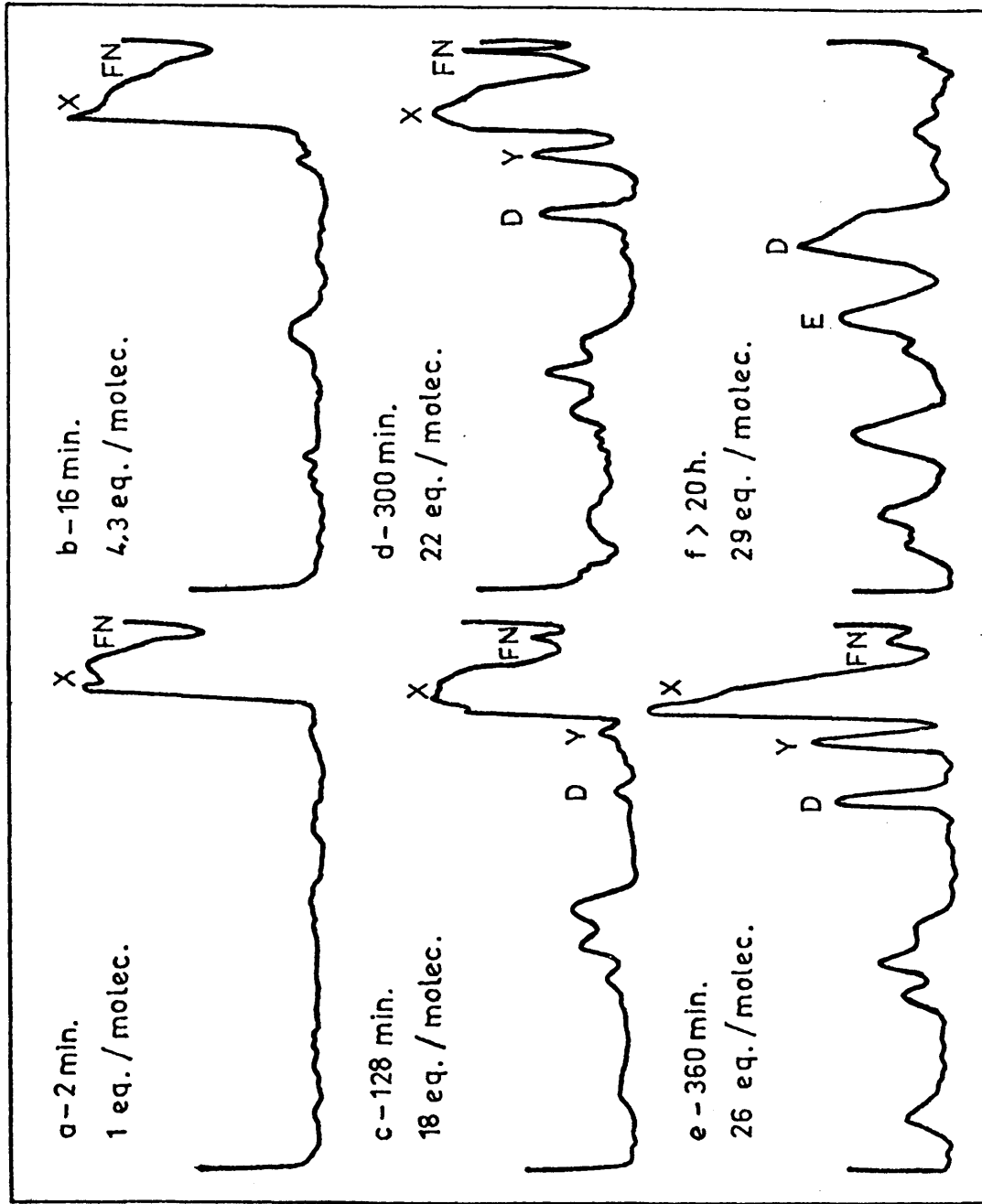
Además del tiempo de incubación figura en cada caso el número de enlaces rotos durante la proteólisis por

FIGURA 12



Equivalentes de NaOH por mol de protefina consumidos en la proteolisis de fibrin6geno humano con plasmina (relaci6n 250:1).

FIGURA 13



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno humano con plasmina (relación 250:1).

molécula de fibrinógeno inicial. Las distintas bandas han sido identificadas por su movilidad de acuerdo con la nomenclatura empleada por Marder y Budzynski (81), no apreciándose por otro lado, diferencias con respecto a las masas moleculares de las especies encontradas por acción de la tripsina, lo cual justifica el empleo de la misma denominación en ambos casos.

En la tabla V se muestran las masas moleculares obtenidas a partir de la movilidad electroforética en distintas etapas de proteólisis. Además de los fragmentos más caracterizados X, Y, D y E se observa la presencia de especies degradadas por la proteólisis al aumentar el tiempo de incubación.

#### III.4.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO HUMANO CON TRIPSINA EN PRESENCIA DE ACIDO $\epsilon$ -AMINOCAPROICO

##### III.4.1.- Estudios cinéticos

Se hicieron estudios de los productos de digestión producidos por acción de la tripsina, en presencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico al 5% (p/v), a lo largo del tiempo, para una relación conocida de fibrinógeno humano:tripsina. Estos experimentos se reprodujeron para unas relaciones 250:1, 500:1, 1000:1 y 2000:1, con el fin de conocer las condiciones de proteólisis más favorables.

En todos los casos se trabajó a una temperatura de

TABLA V

Fragmento	Masas moleculares obtenidas		
	Fase de formación de material coagulable	Fase de pérdida de material coagulado	Fase de estabilización del material soluble
FN	340.000	340.000 (trazas)	340.000 (trazas)
X	(280.000 200.000)	(255.000 190.000)	(240.000 190.000) (trazas)
Y		155.000	155.000
D temprano		100.000	100.000
D tardío			80.000
DP 1		75.000	
E			45.000
DP 2		38.000	36.000
DP 3		30.000	
DP 4		23.000	
DP 5			19.000
Familia P		(11.000 9.500)	(10.500 8.200)

23,5-25°C y el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico se encontraba en el medio de reacción en el momento de adición de la enzima.

De esta forma se pudieron comparar los resultados obtenidos en presencia y ausencia de dicho compuesto y estudiar las diferencias obtenidas.

La variación del material coagulado por acción de la tripsina se ve en la figura 14 curva I. En las etapas iniciales de digestión con tripsina hay un descenso rápido del material en solución reflejado en la formación de un coágulo consistente. Se obtiene la máxima coagulación en un periodo de tiempo comprendido entre los 2 y 60 minutos iniciales, dependiendo directamente de la proporción relativa de tripsina presente en el medio de reacción.

Los valores máximos de coagulación obtenidos se especifican a continuación, en la tabla VI, siendo la relación 2000:1 la más favorable.

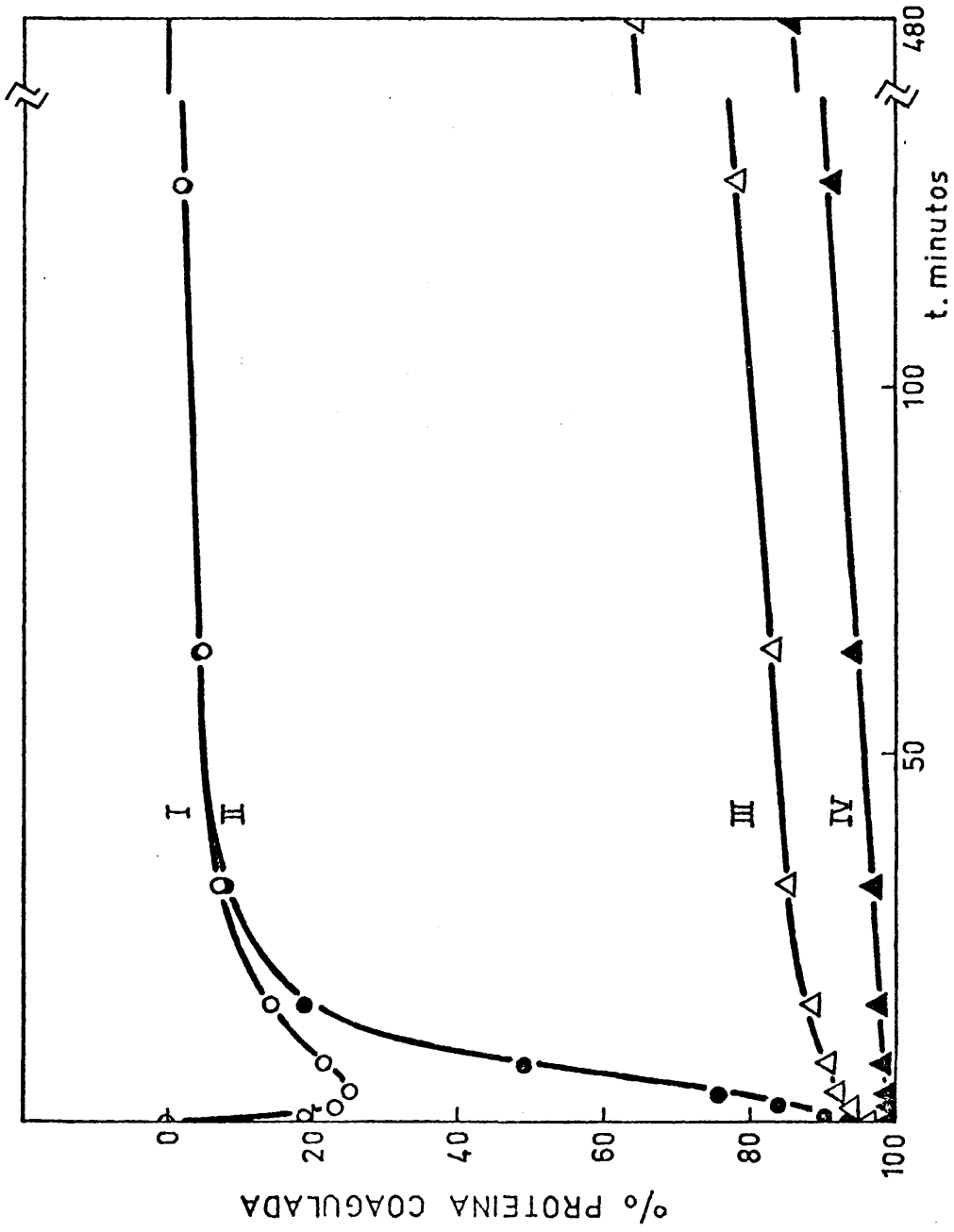
TABLA VI

Coagulación de fibrinógeno humano por acción de la tripsina, en presencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (5% p/v)

Relación FN:T	% material coagulado máximo	Tiempo (min.)
250:1	21	2-4
500:1	25	4
1000:1	31	16
2000:1	32	60

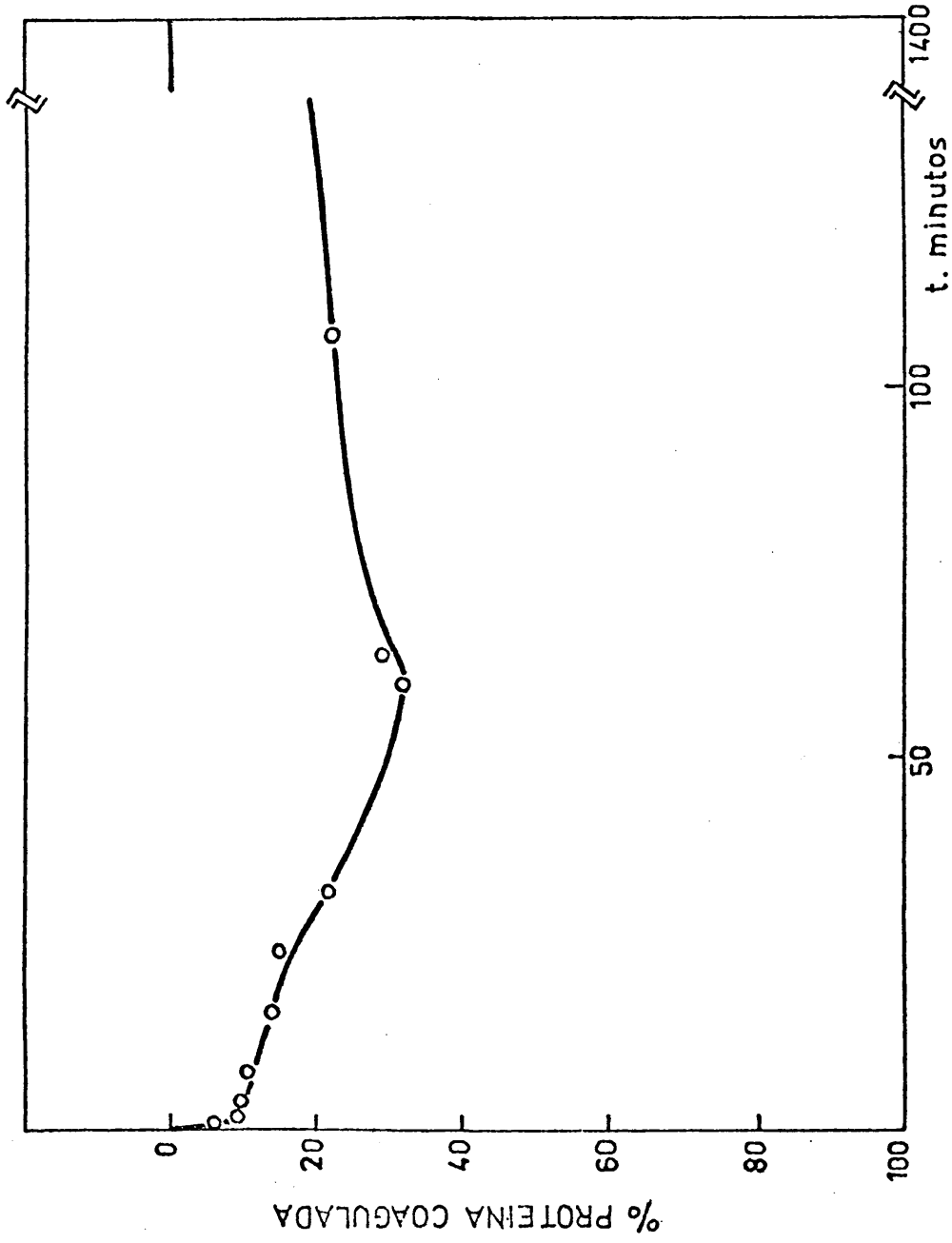
Según se ve en la figura 15, para las digestiones enzimáticas más lentas, es decir, para las relaciones 1000:1 y 2000:1, puede apreciarse que en esta primera eta

FIGURA 14



I.- Proteolisis de fibrinógeno humano:tripsina=500:1, en presencia de  $\epsilon$ -ACA 5%. II.- Tratamiento adicional con trombina del material soluble. III.- Incubación a 57°C, 30 min. IV.- Precipitación con TCA al 10%.

FIGURA 15



Proteolisis de fibrinógeno humano:tripsina=2000:1, en presencia de  $\epsilon$ -ACA 5%.

pa se superponen dos procesos con distintas velocidades, puesto que hay una inflexión en la pendiente.

Durante el resto del proceso, los resultados obtenidos son semejantes a los de los otros casos.

#### III.4.2.- Material coagulable por trombina

#### III.4.3.- Material coagulable por acción de la temperatura

Como puede verse en la figura 14 curva II, por acción de la trombina hay una mayor cantidad relativa de material coagulado, lo que indica que contrariamente a lo que sucede en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico todavía existe material coagulable cuando comienza a disminuir el material coagulado por la tripsina. Sin embargo, el material termoestable alcanza niveles más bajos que los observados en ausencia del ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (figura 14 curva III).

#### III.4.4.- Material soluble en TCA al 10%

Según se ve en la figura 14 curva IV, la cantidad de material soluble tras el tratamiento con ácido tricloroacético al 10% de concentración final, es mucho menor que el tratamiento con calor.

Se observa que el aumento de péptidos es pequeño para los tiempos de incubación en los que aparece coágulo, aumentando casi linealmente con el tiempo.

### III.5.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINOGENO HUMANO CON TRIPSINA EN UREA 3,5M

Con estos experimentos se quieren estudiar las mo dificaciones sufridas en los productos de proteolisis al encontrarse el sustrato en un medio ligeramente desovillante de la protefna y para el que el enzima mantiene una ac tividad apreciable.

Por otro lado, tienen un fin comparativo con estudios sobre fibrina solubilizada en el mismo medio, siendo así posible comparar los resultados y estudiar las posibles diferencias obtenidas.

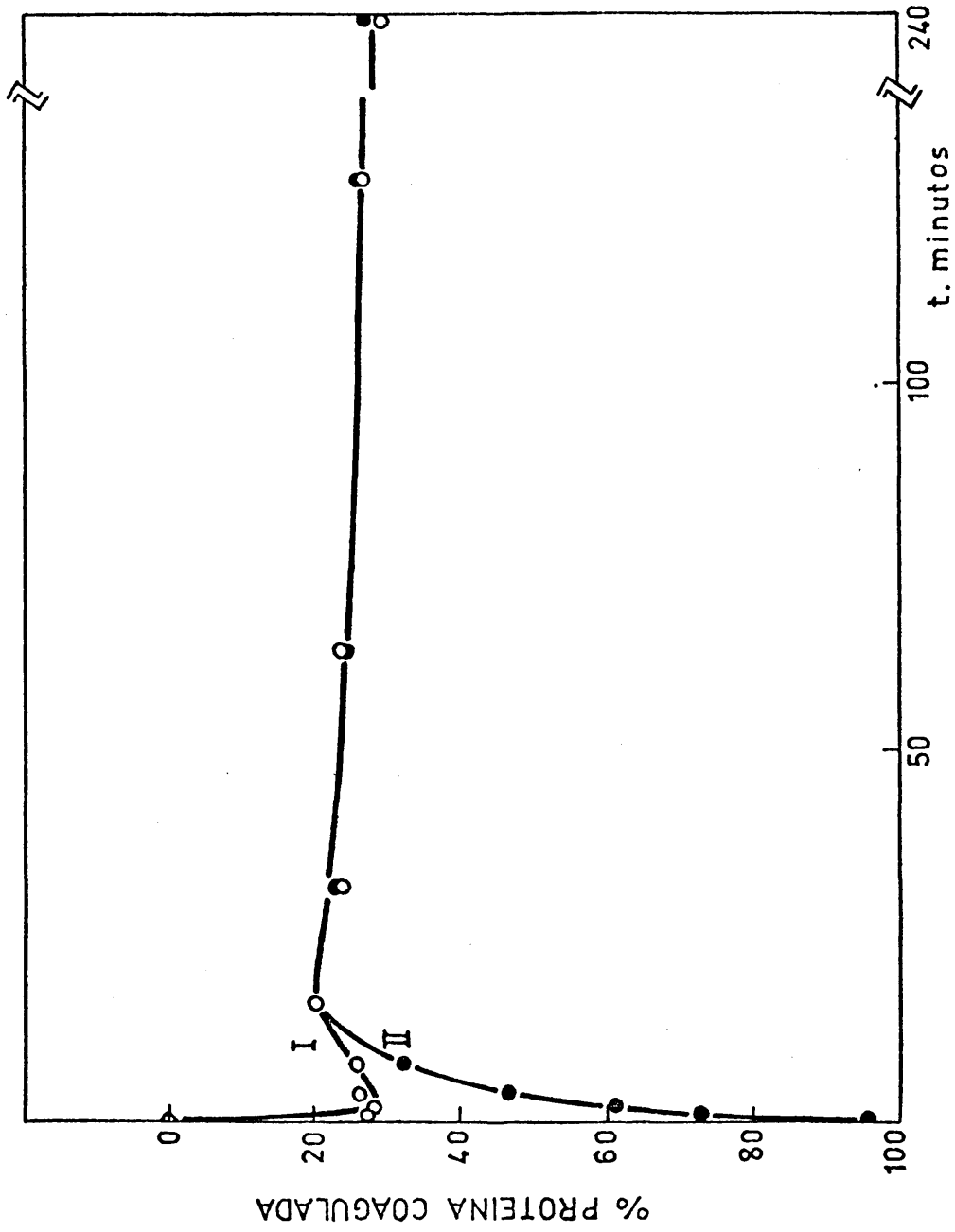
#### III.5.1.- Estudios cinéticos

El estudio se realizó a una relación de fibrinógeno:tripsina = 500:1, en NaCl 0,15M, urea 3,5M, pH 7,5. La concentración de fibrinógeno fué de 5 mg/ml y la digestión enzimática se realizó a una temperatura de 23,5-25°C.

Con el fin de determinar si en estas condiciones el efecto de la tripsina es comparable al observado en presencia de urea, una vez detenida la proteolisis por adición de inhibidor, las muestras obtenidas a distintos tiempos de incubación se sometieron a una diálisis exhaustiva con el fin de eliminar totalmente la urea.

Como se ve en la figura 16 curva I, existe una pri mera fase en la que el material obtenido es insoluble en

FIGURA 16



I.- Proteolisis de fibrinogeno humano:tripsina=500:1, en urea 3,5M-PH 7,5. II.- Tratamiento adicional con trombina del material soluble tras la eliminación de la urea del medio.

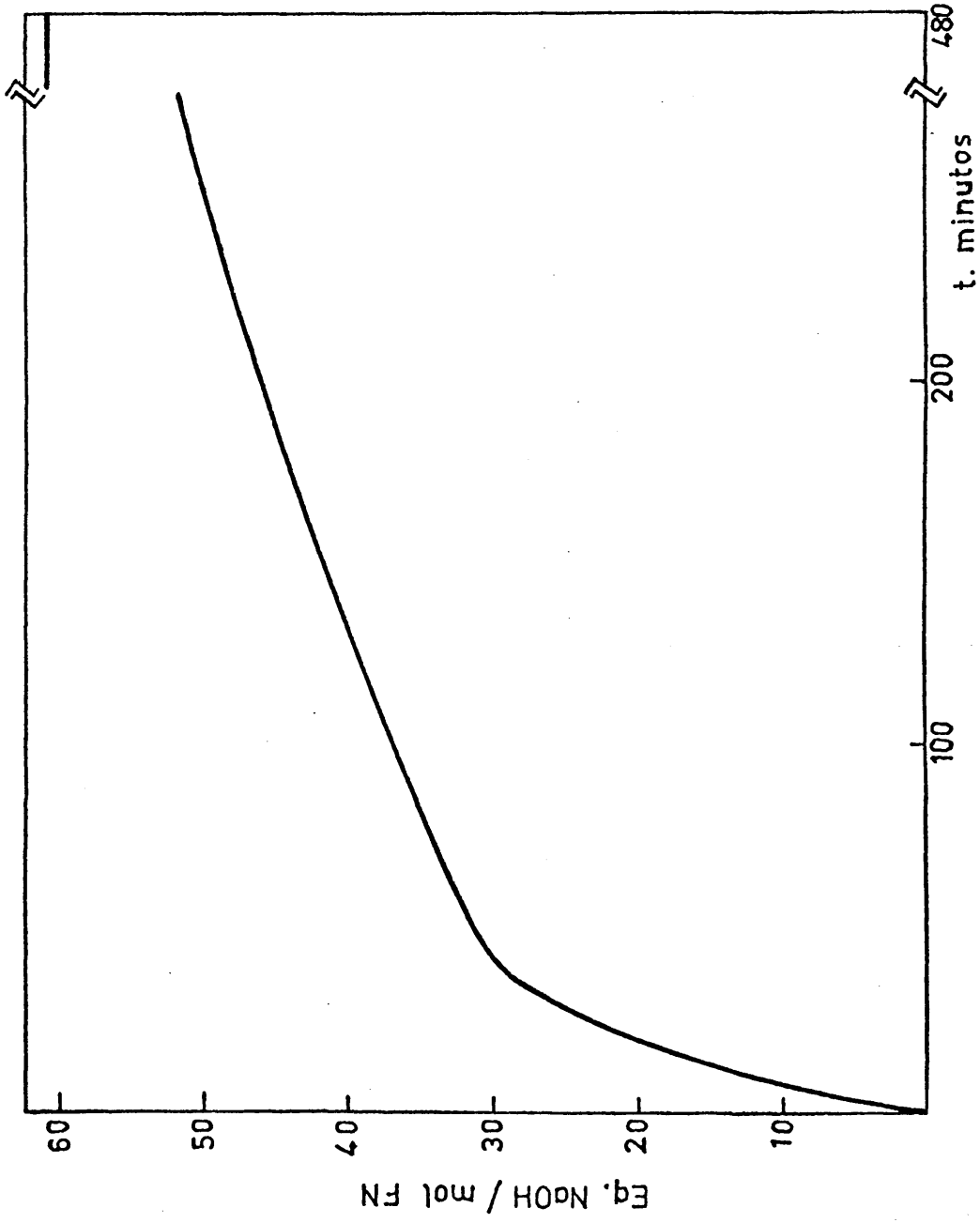
disolución salina hasta un 28% en el caso más favorable de formación de coágulo. Posteriormente hay un aumento del material en disolución, pero, en ningún caso se llega a un estado de recuperación total del material, ya que a medida que avanza la proteólisis existe una pérdida de fragmentos peptídicos debida a la diálisis. Por ello se consigue hasta un 80% del material inicial y a partir de ese punto hay nueva disminución de la cantidad de proteína presente en las muestras.

Se realizaron una serie de proteólisis controlando con un pH-estato el número de enlaces rotos por molécula inicial, en cada una de las etapas de proteólisis estudiadas. Los resultados se muestran en la figura 17.

Comparando con la figura 9 se observa que la rotura de uniones peptídicas es ligeramente más lenta que para el fibrinógeno en ausencia de urea, durante las primeras etapas de la cinética. Sin embargo, aún cuando para la cantidad de material soluble se alcanza la fase de estabilización, la tripsina continua su acción sobre los productos de digestión logrados, llegándose en este caso a un total de 61 enlaces rotos por molécula de fibrinógeno, al cabo de 8 horas de digestión.

Al someter muestras de las distintas etapas de proteólisis a electroforesis en gel, se obtienen unos densitogramas más complejos que en casos anteriores, como pue-

FIGURA 17



Equivalentes de NaOH por mol de proteína consumidos en la proteólisis de fibrinógeno humano con tripsina (relación 500:1), en urea 3,5 M, pH 7,5.

de apreciarse en la figura 18.

Durante la primera y segunda fase de la proteólisis se detecta una banda electroforética correspondiente al fibrinógeno (figura 18 a) que va haciéndose cuantitativamente menor al avanzar el ataque enzimático.

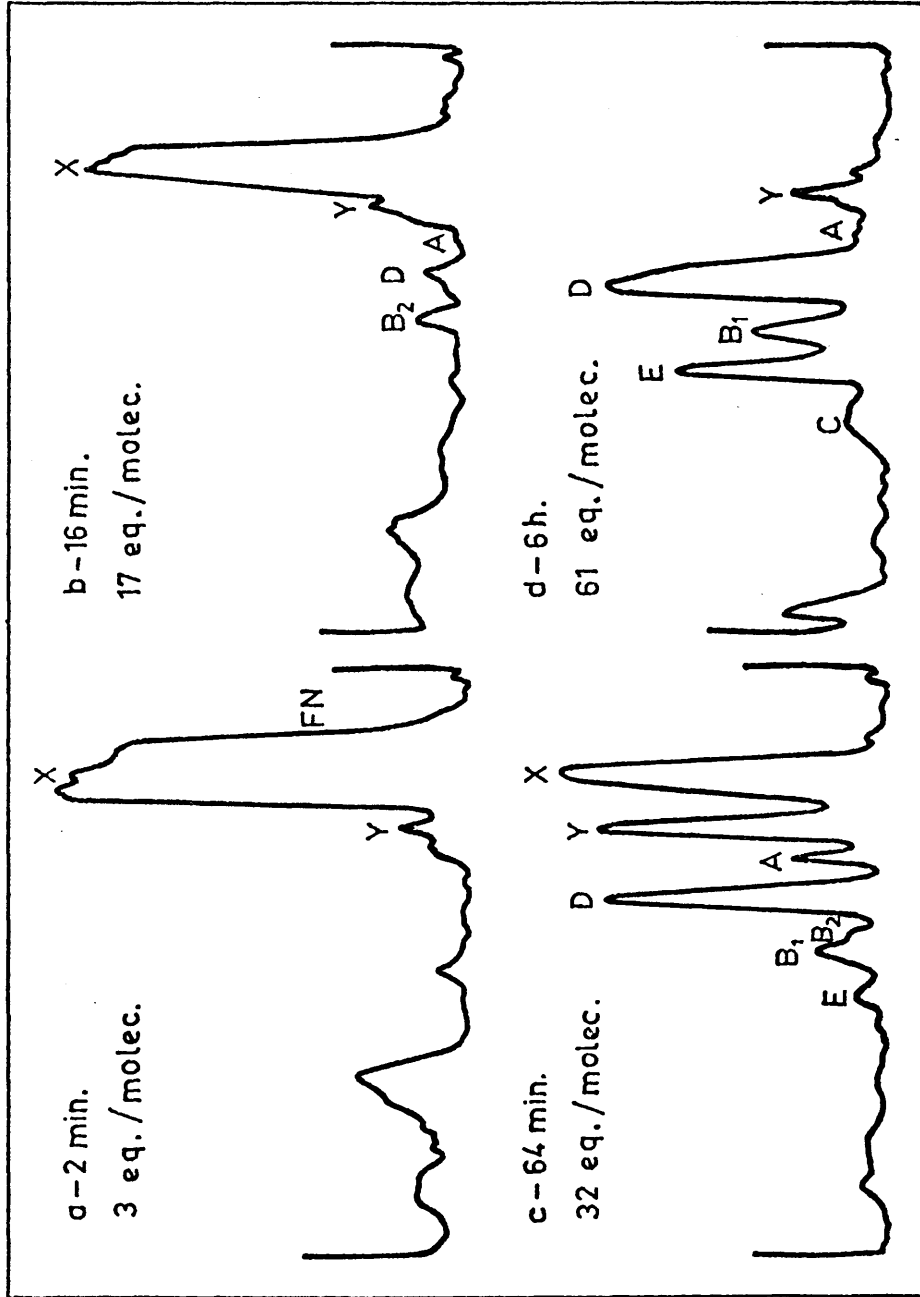
Junto a dicha banda está presente, desde los primeros momentos de ataque, la correspondiente al fragmento X que, como en casos anteriores, está formada por una familia de entidades moleculares cuyo tamaño oscila entre  $280.000 \pm 10\%$  y  $220.000 \pm 10\%$  Daltons. Con el avance del ataque enzimático hay un desplazamiento de los valores más altos de X a los de menor masa molecular, como puede apreciarse en el densitograma de la figura 18 b.

Posteriormente aparecen bandas electroforéticas correspondientes a los fragmentos Y y D, pero además otras intermedias de  $130.000 \pm 10\%$ ,  $75.000 \pm 10\%$  y  $65.000 \pm 10\%$  Daltons (figura 18 c), a los que se asignan las denominaciones A, B<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>, respectivamente.

Más tarde se hace patente una banda electroforética a la que corresponde un valor de  $46.000 \pm 10\%$  Daltons y que se identifica, por tanto, como el fragmento E. Al mismo tiempo se observa otra especie molecular cuya movilidad relativa corresponde a una masa molecular de  $32.000 \pm 10\%$  (figura 18 d) que denominamos fragmento C.

Todos estos datos se recogen en la tabla VII.

FIGURA 18



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrinógeno humano con tripsina en urea 3,5M (relación 500:1).

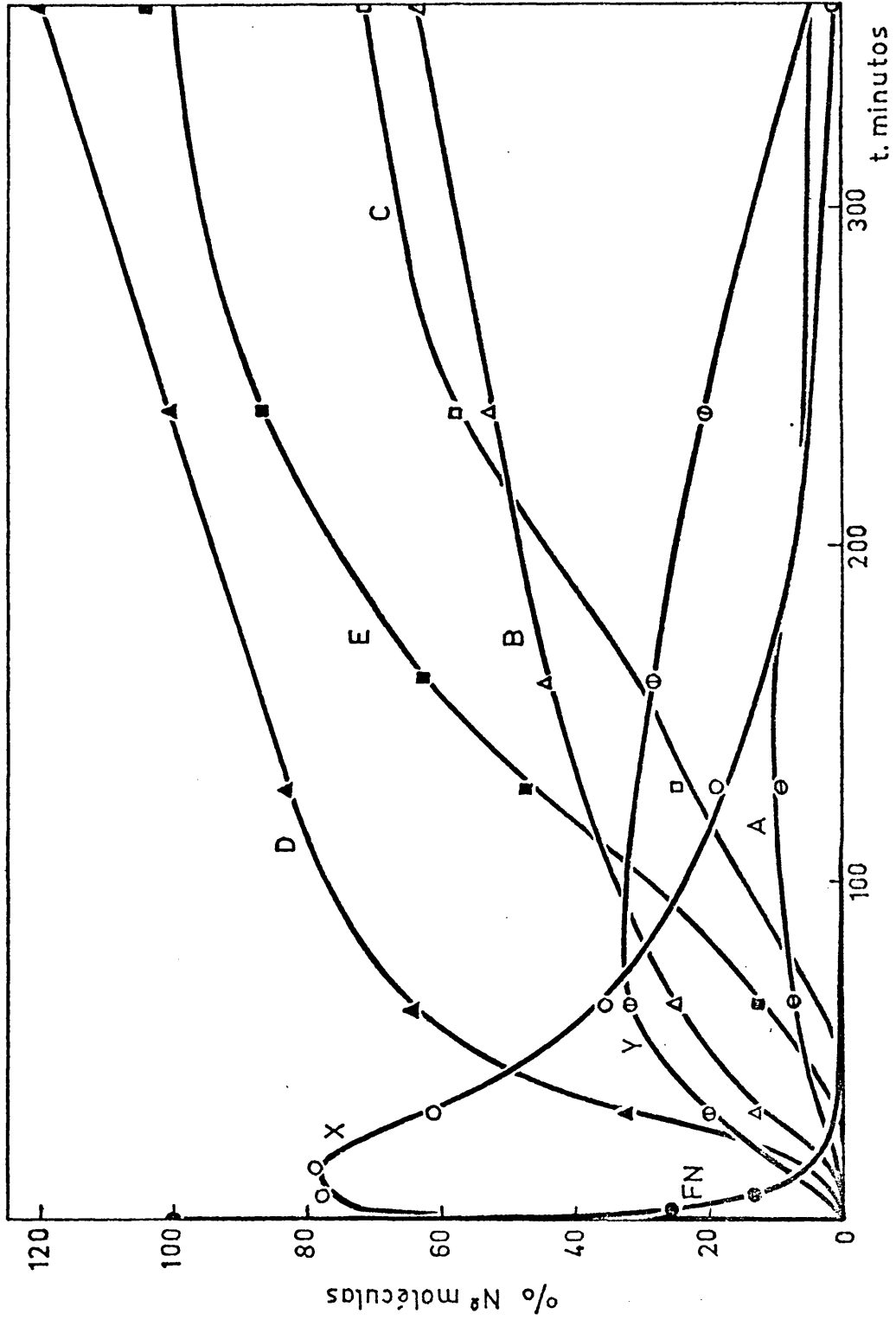
TABLA VII

Fragmento	Masa molecular (EGPA)
FN	340.000
X	( 280.000 220.000
Y	170.000
A	130.000
D	95.000
B <sub>2</sub>	75.000
B <sub>1</sub>	65.000
E	46.000
C	32.000

Otros fragmentos de masa molecular más pequeña , que están presentes en proporción considerable desde las primeras etapas de proteólisis, van disminuyendo su tamaño con el avance del ataque enzimático, ya que aumenta su movilidad, llegando a no ser apenas observables en las últimas etapas, debido a las condiciones en las que se realizó la electroforesis.

A partir de las áreas de los picos observados en los densitogramas y de las masas moleculares correspondientes a cada especie, se ha hecho un estudio de la cinética de formación y degradación de los distintos fragmentos a lo largo de la proteólisis. En la figura 19 se representa el tanto por ciento de moléculas de cada especie a lo largo del tiempo, tomando como 100% el número de mo-

FIGURA 19



Variación con el tiempo de los productos de degradación con tripsina del fibrinógeno humano en urea 3,5M.

lécúlas de fibrinógeno de que se partió inicialmente.

Se observa cómo la cantidad de fibrinógeno desciende rápidamente en forma exponencial en favor del fragmento X, que presenta un rápido incremento coincidente en el tiempo, con la desaparición del fibrinógeno, para luego disminuir a su vez más lentamente.

La degradación de X va acompañada de la aparición de los fragmentos Y, A, D y B. La cantidad de Y presente en las muestras pasa por un máximo, retrasado con relación al del X y que casi coincide con la aparición de los fragmentos E y C. A partir de esta etapa, Y empieza a disminuir lentamente.

Es de resaltar que la cinética del fragmento A es semejante a la del Y, aunque aparece en mucha menor proporción y presenta un máximo algo más retrasado.

Los fragmentos D y B tienen un crecimiento paralelo que coincide con la desaparición del X, mientras que el E crece a medida que disminuye el fragmento Y.

Por otra parte, el fragmento C muestra un crecimiento más lento que los demás productos de degradación.

### III.5.2.- Material coagulable por trombina

El material proteolizado con tripsina, una vez dializado frente a un medio libre de urea se trató a continuación con trombina. Como se ve en la figura 16 curva II,

el resultado de la proteólisis produce un material soluble que todavía es en parte susceptible de coagular por la trombina, hasta que se alcanza un grado de fragmentación para el cual no se observa más coagulación.

### III.6.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINA SOLUBLE CON TRIPSINA Y PLASMINA

Para estos experimentos se partió de fibrina obtenida como se indica en las técnicas experimentales, redisuelta en NaCl 0,15M, pH 7,5 y urea 2,35 ó 3,5M, según los casos. Se usó una concentración de proteína de 5 mg/ml.

Por experimentos de velocidad de sedimentación utilizando óptica Schlieren se identificaron las especies moleculares o estados de agregación de la fibrina en urea 3,5 y 2,35M, así como la proporción de cada una de ellas; los resultados se detallan más adelante (véase tabla X).

En urea 3,5M toda la proteína está incluida en un pico homogéneo con un coeficiente de sedimentación igual al que se determina para el fibrinógeno en las mismas condiciones.

Sin embargo, para urea 2,35M, el material está repartido en tres picos bastante simétricos y diferentes áreas cuyas proporciones vienen indicadas en la tabla X ya mencionada. En estas condiciones el componente que se-

dimenta más lentamente ( $s = 6,1 S$ ) es el que tiene el mismo tamaño que el fibrinógeno, apareciendo especies moleculares de mayor coeficiente de sedimentación por formación de polímeros de fibrina.

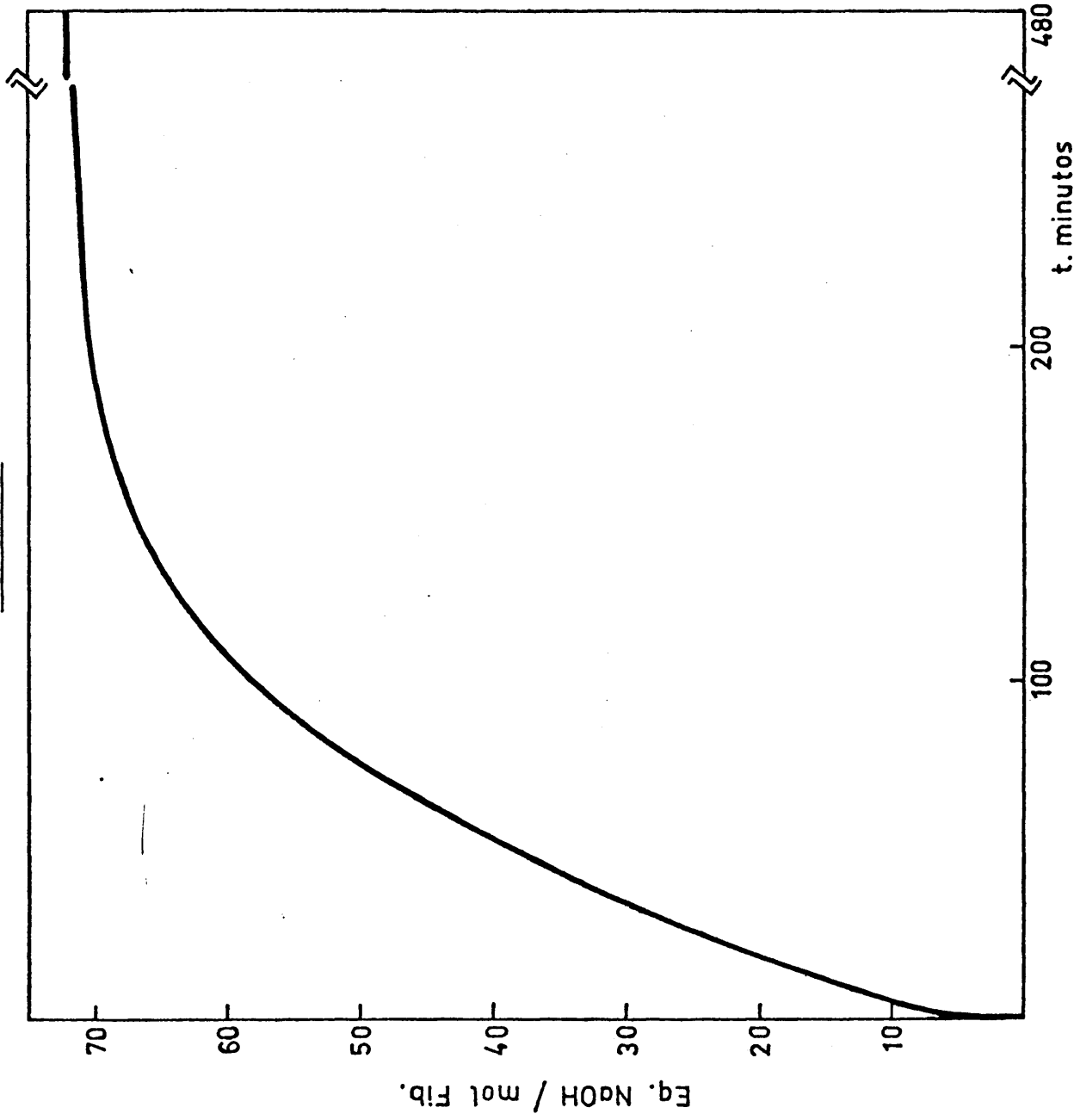
También se estudió fibrina disuelta en NaCl 0,15M, urea 2,35M, pH 6,75 (tabla X), viendo que el proceso está aún más desplazado hacia agregados de mayor masa molecular. Este paso se ha producido variando exclusivamente el pH hacia valores más ácidos.

#### III.6.1.- Estudios cinéticos sobre fibrina soluble en NaCl 0,15M, urea 2,35M, pH 7,5

El estudio se realizó en pH-estato en idénticas condiciones a las descritas anteriormente, manteniendo el pH de reacción en 7,5. La relación de fibrina:tripsina empleada fué de 500:1.

En primer lugar se determinó el número de enlaces rotos por molécula de fibrinógeno inicial, llegándose a los resultados que se indican en la figura 20. Se ve que durante los primeros momentos, la proteólisis ocurre con gran velocidad, ya que en el primer minuto se llega a un total de 7 enlaces rotos. A partir de este punto, la velocidad de rotura de enlaces peptídicos va disminuyendo a lo largo del tiempo de una forma constante, haciéndose la pendiente menor que en el caso de la proteólisis del fi-

FIGURA 20



• Equivalentes de NaOH por mol de protefina consumidos en la proteolisis de fibrina humana por tripsina (relación 500:1) en urea 2,35M, pH 7,5.

brinógeno en la misma proporción de enzima, sin embargo, el número de enlaces rotos a los 200 min es mucho mayor, llegándose a 72 enlaces rotos por molécula de fibrina inicial, cuando la velocidad de nuevas roturas es ya muy lenta.

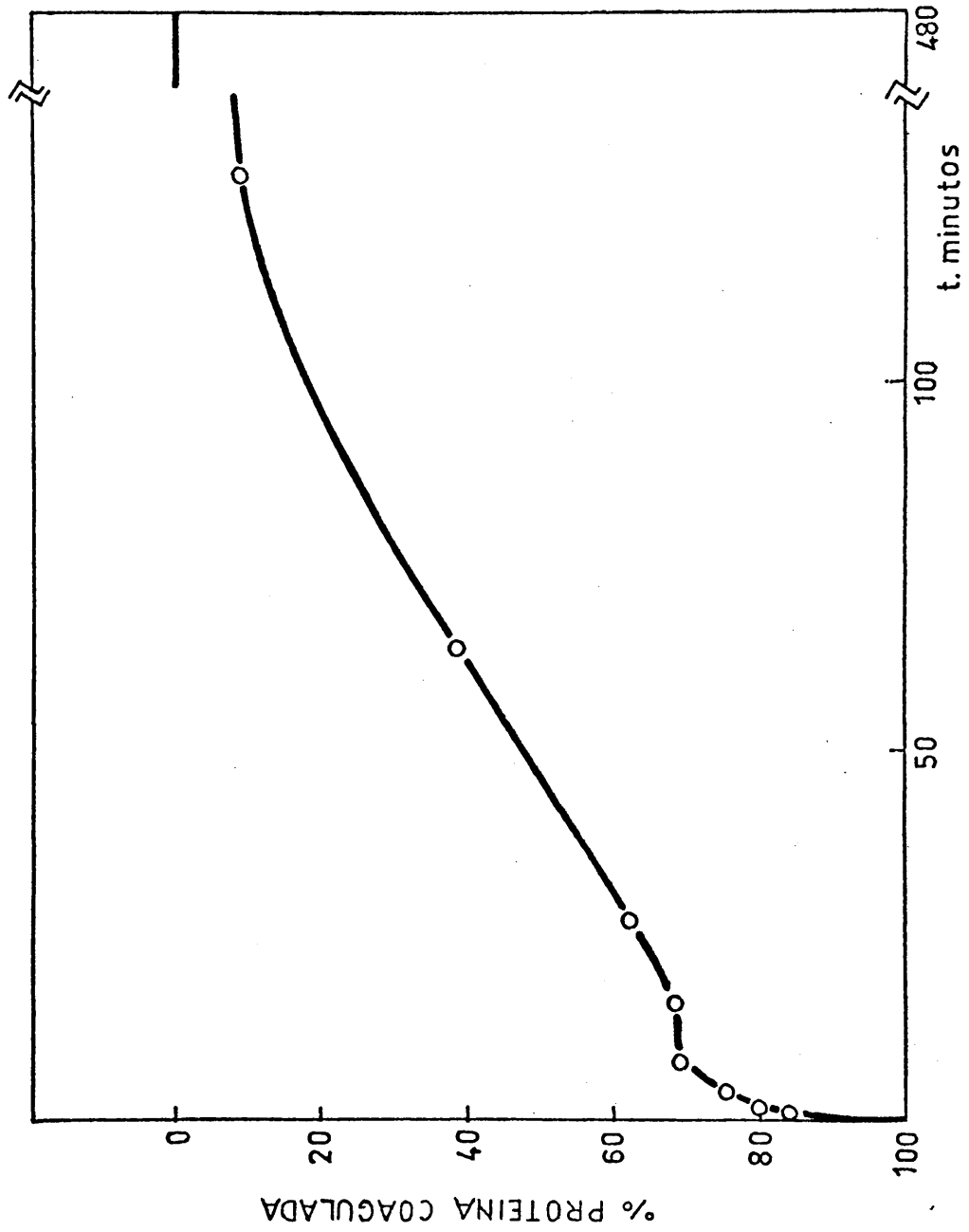
Una vez eliminada la urea de cada una de las muestras mediante diálisis, se determinó la cantidad de material soluble en las distintas etapas, llegando a los resultados de la figura 21. Este material corresponde a los productos de degradación por la acción de la tripsina sobre la fibrina, que han perdido la capacidad de coagular.

Como se ve en la figura 21, durante los primeros momentos de ataque hay una rápida pérdida de la coagulabilidad de forma que para la relación de proteína:enzima usada, al cabo de los 4 primeros minutos ha disminuido en un 20% la coagulabilidad. Sin embargo, el coágulo retirado de estas fracciones es consistente a la acción mecánica.

En los siguientes 12 minutos, la cantidad de material soluble se mantiene en unos valores próximos al 30%; sin embargo, el coágulo pierde su resistencia.

Posteriormente, hay otra rápida disminución en la coagulabilidad. El coágulo obtenido en estas etapas sigue siendo poco consistente, llegando a tomar aspecto de pequeño precipitado en muestras correspondientes a un tratado

FIGURA 21



Proteolisis fibrina humana:tripsina=500:1 en urea 2,35M, pH 7,5.

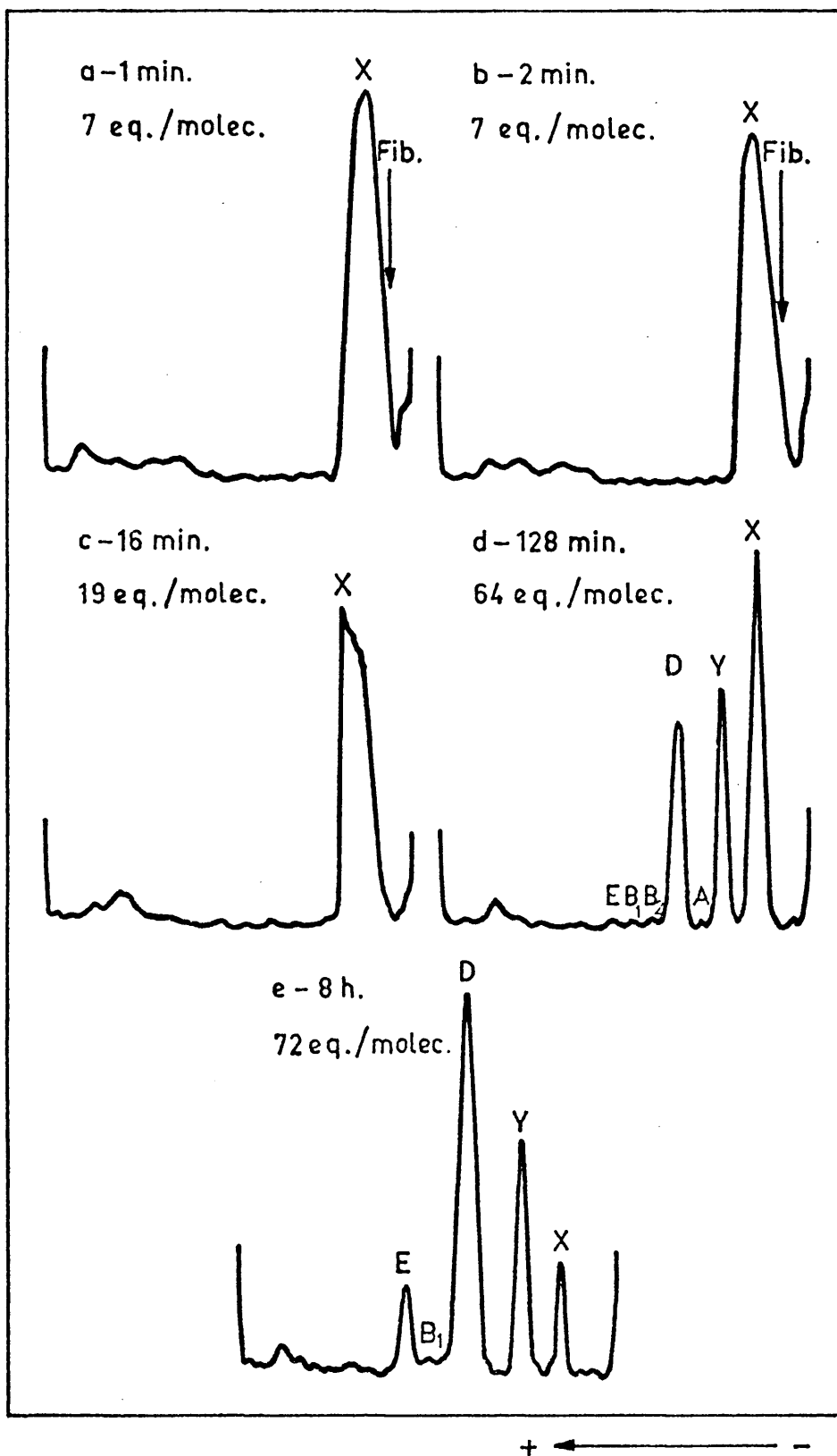
miento con tripsina superior a 64 minutos. A los 128 minutos está en estado soluble más del 90% del material, tendiendo a partir de este punto y de forma asintótica al 100% de material inicial en estado soluble. Se llegó a unos niveles del 100% de material soluble a pesar de la diálisis, ya que en este caso se usó una membrana (Visking) de poro más fino que sólo deja pasar material de baja masa molecular que no absorbe a 280 nm.

En la figura 22 se ven los fragmentos obtenidos en las distintas etapas de proteólisis. En los primeros momentos, la mayor parte del material sigue como fibrina, como se ve en la figura 22a. Sin embargo, la cantidad de fibrina va disminuyendo en favor de la formación de fragmentos con la misma movilidad que los X obtenidos de fibrinógeno, como se ve comparando los densitogramas 22,a y 22,b y fragmentos de baja masa molecular desde los momentos iniciales de proteólisis, como los observados en el caso del fibrinógeno por rotura de unos 7 enlaces/molécula.

Como se ve en la figura 22c, este proceso de degradación de la fibrina en favor del fragmento X continúa en la etapa en que apenas hay pérdida de coagulabilidad, aunque se ha roto un promedio de 19 enlaces/molécula, pero el coágulo formado pierde su consistencia.

Cuando el coágulo formado tras la diálisis ya no

FIGURA 22



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrina humana con tripsina (relación 500:1) en urea 2,35M.

es consistente y disminuye con respecto al total de la proteína presente, van apareciendo los fragmentos Y y D. Al final de esta etapa, a los 128 minutos (figura 22d), no existe prácticamente fibrina, y sí fragmentos X tardíos, Y y D, empezando a formarse el fragmento E. Sin embargo, para la concentración de urea de 2,35M, apenas se hacen visibles los fragmentos A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.

A las 8 horas, etapa correspondiente a la fase de estabilización de material soluble (figura 22e) quedan sólo los restos de X de muy alta movilidad y el fragmento Y empieza a disminuir. Sin embargo, los fragmentos D y E han aumentado mucho y algo, aunque en baja proporción, los B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Los fragmentos peptídicos han ido disminuyendo su masa molecular a lo largo de la proteólisis.

### III.6.2.- Estudios cinéticos sobre monómero de fibrina en NaCl 0,15M, urea 3,5M, pH 7,5

También en este caso se hizo uso del pH-estato, tanto para los estudios con tripsina como con plasmina, bajo las condiciones acostumbradas.

#### III.6.2.1.- Digestión con tripsina

Se empleó una relación de fibrina:tripsina de 500:1.

Atendiendo al número de enlaces rotos en cada una de las etapas de la proteólisis con tripsina, hay claras

diferencias de comportamiento entre la fibrina polimerizada en gran parte en urea 2,35M y la que se encuentra en forma de monómero en urea 3,5M, como se comprueba comparando las figuras 20 y 23, respectivamente.

Así, vemos en la figura 23 que durante los 2 primeros minutos de proteólisis, la tripsina actúa muy lentamente sobre la fibrina en urea 3,5M (1 enlace roto).

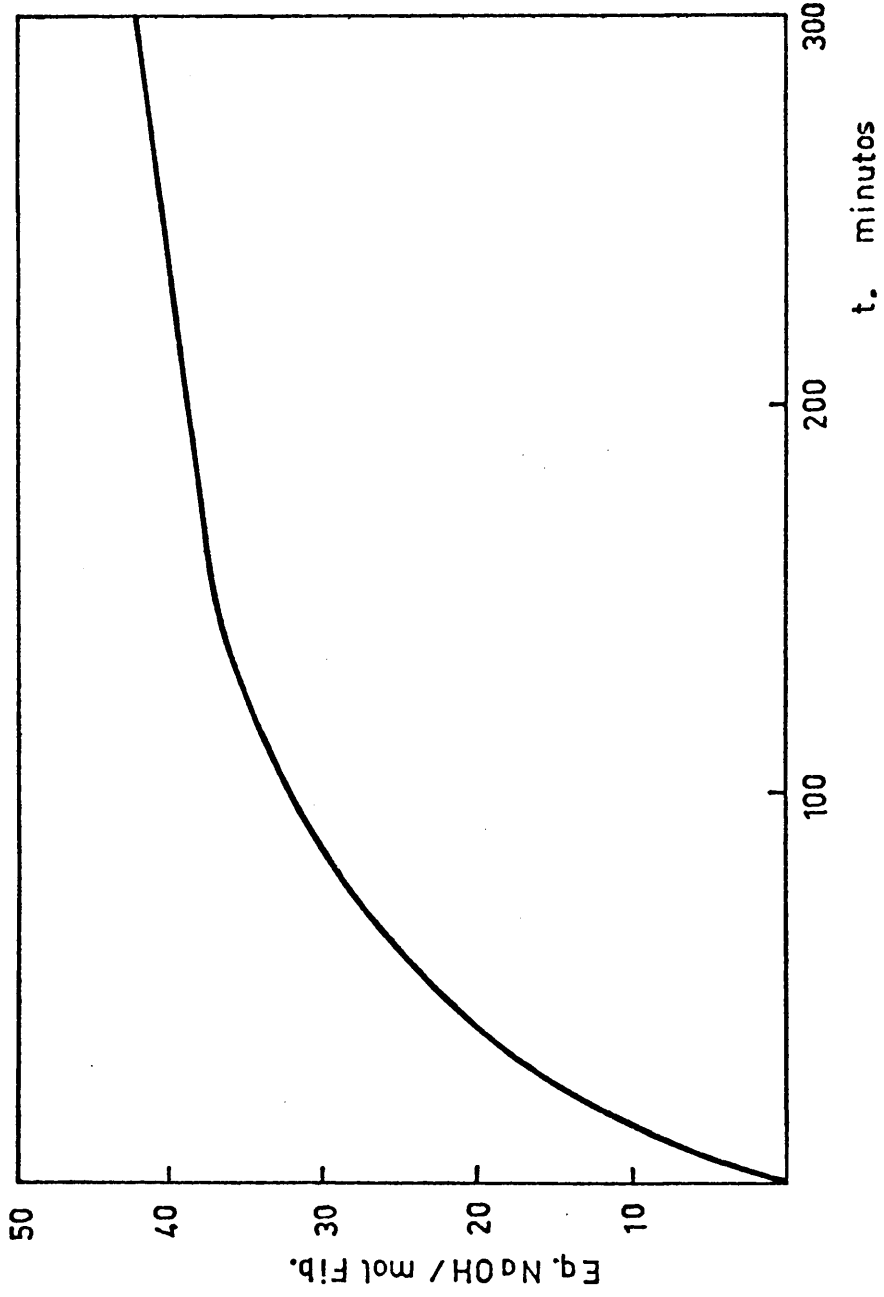
Posteriormente, aumenta algo la velocidad de rotura de enlaces peptídicos, aunque sigue siendo más lenta que en urea 2,35M. A las 4 h de proteólisis se han roto 40 enlaces peptídicos, en urea 3,5M, mientras que en urea 2,35M se alcanza el valor de 71 enlaces rotos por molécula de fibrina inicial.

Sin embargo, una vez transcurridas más de 7 horas de proteólisis, la velocidad de acción de la tripsina crece enormemente, llegándose en nuestro caso a un valor final de 87,5 enlaces rotos por molécula de fibrina inicial en urea 3,5M.

Una vez eliminada totalmente la urea del medio por diálisis, de todas las etapas de proteólisis, se obtiene coagulación de material en los primeros estados de digestión enzimática. En nuestro caso, hay formación de coágulo consistente en las muestras incubadas con la tripsina durante 2 minutos o menos.

En las etapas siguientes, se forma un coágulo poco

FIGURA 23



Equivalentes de NaOH por mol de protefina consumidos en la proteolisis de fibrina humana con tripsina (relación 500:1) en urea 3,5 M, pH 7,5.

consistente que va disminuyendo en tamaño al avanzar la acción triptica, llegando a convertirse en un pequeño pre ci pi ta a los 32 min. En las etapas posteriores no pre ci pi ta material aún en ausencia total de urea.

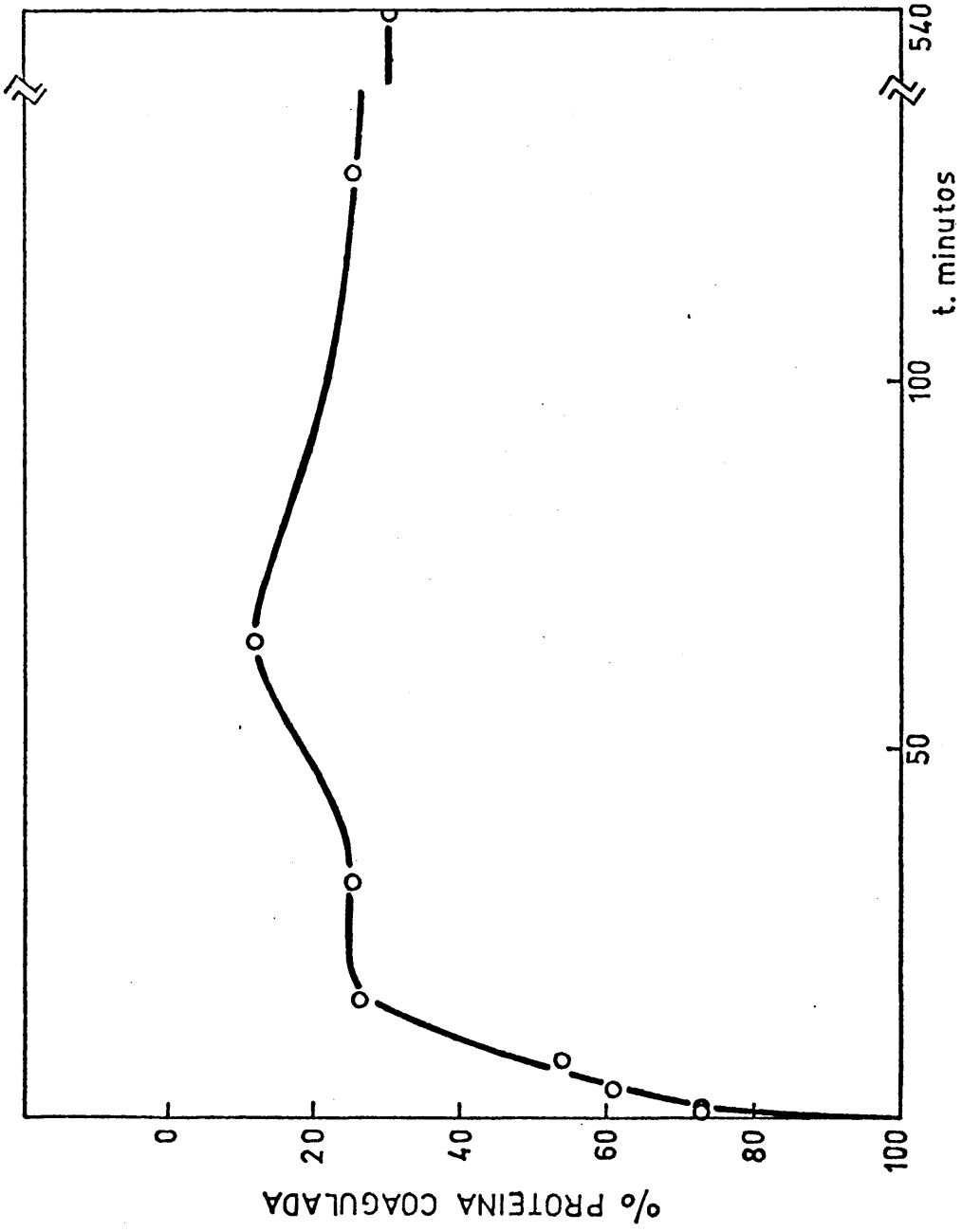
Los resultados obtenidos se representan en la figu ra 24, donde se ve que durante los 16 minutos iniciales de proteolisis, para la relación de sustrato:enzima usada, aumenta rápidamente la cantidad de material en solución.

A continuación hay un estado de estabilización de la cantidad de material soluble en un 75%, y corresponde a la etapa de obtención de un pequeño precipitado. Posteriormente aumenta la proporción de material soluble que llega a un 87% sin que aparezca coagulación. A partir de este estado, el material en solución disminuye nuevamente, ya que por diálisis se pierden gran parte de los péptidos formados. De este forma, a las 9 horas de incubación de la fibrina con tripsina, sólo un 70% de material soluble no es dializable.

Para identificar los productos de degradación formados por acción de la tripsina, se sometieron a EGPA una serie de muestras cuya proteolisis se detuvo a distintos tiempos.

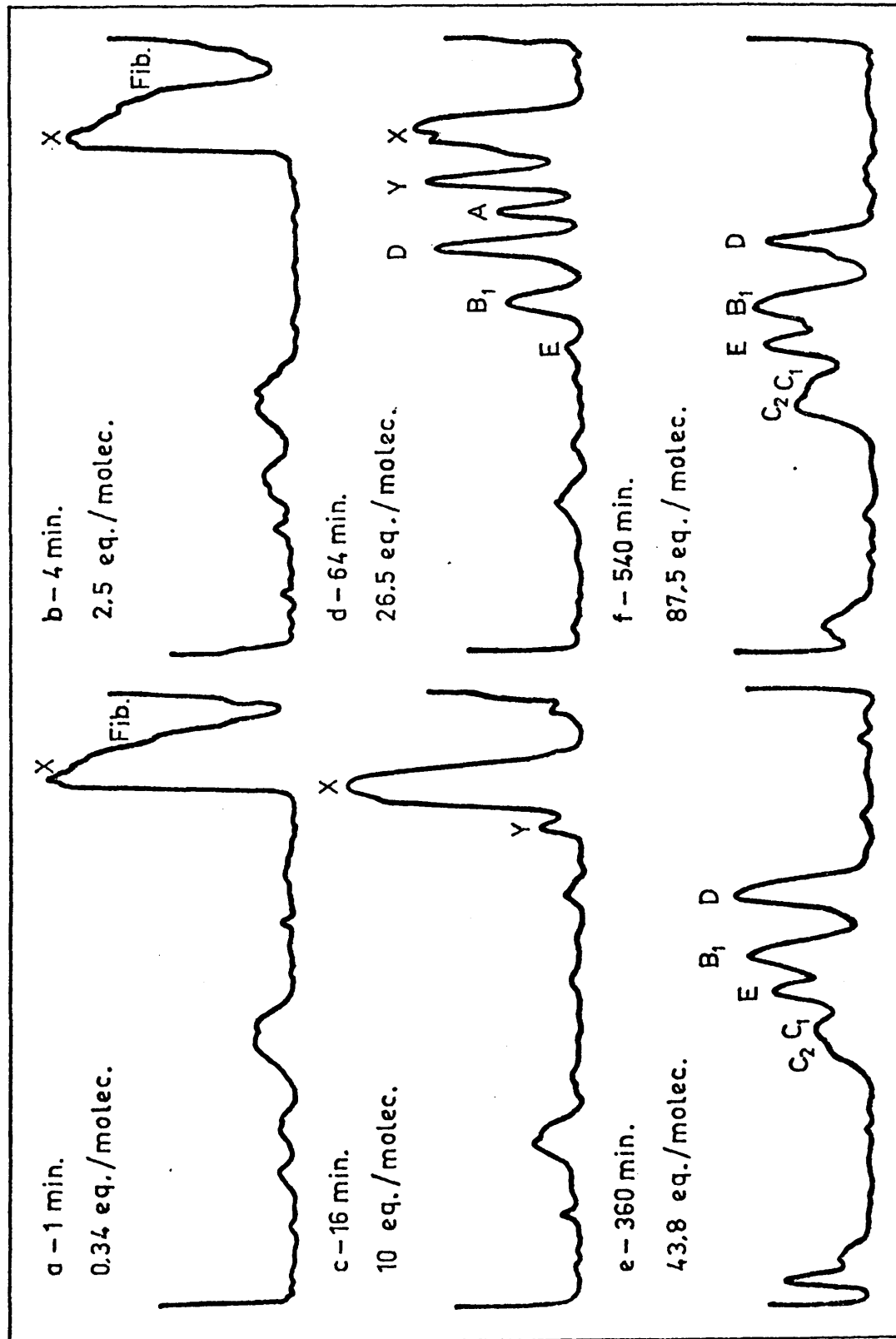
Los resultados obtenidos se especifican en la figu ra 25. Se ve que los fragmentos de alta masa molecular son semejantes a los observados en el caso del fibrinógeno en

FIGURA 24



Proteolisis fibrina humana:tripsina=500:1 en urea 3,5M , pH 7,5.

FIGURA 25



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrina humana con tripsina (relación 500:1) en urea 3,5M, pH 7,5.

TABLA VIII

Fragmento	Masa molecular		
	Fase de coágulo consistente	Fase de degradación del coágulo	Fase de material soluble
Fibrina	330.000	330.000 (trazas)	
X	(295.000 240.000)	(270.000 220.000)	(260.000 220.000)
Y		170.000	170.000
A		130.000	130.000
D		90.000	90.000
B			64.000
E			45.000
C <sub>1</sub>			36.000
C <sub>2</sub>			30.000

urea 3,5M, como se especifica en la tabla VIII. Por otro lado, se producen especies de baja masa molecular desde los momentos iniciales de ataque, con movilidades que se van haciendo mayores a lo largo de la proteólisis y cuya masa molecular es muy semejante a la de los fragmentos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> (36.000-30.000), que aparecen mucho después de haberse degradado totalmente los péptidos iniciales.

A partir del área de los picos de los densitogramas (figura 25) y de la masa molecular de los fragmentos correspondientes de las distintas etapas de proteólisis,

se calculó la proporción de cada una de las especies moleculares consideradas en la tabla anterior, a lo largo del tiempo, llegando a los resultados indicados en la figura 26.

Comparando los resultados obtenidos en este caso y para el fibrinógeno en iguales condiciones (figuras 26 y 19, respectivamente) se aprecia que la degradación del número de fibrina es muy semejante a la del fibrinógeno.

#### III.6.2.2.- Digestión con plasmina

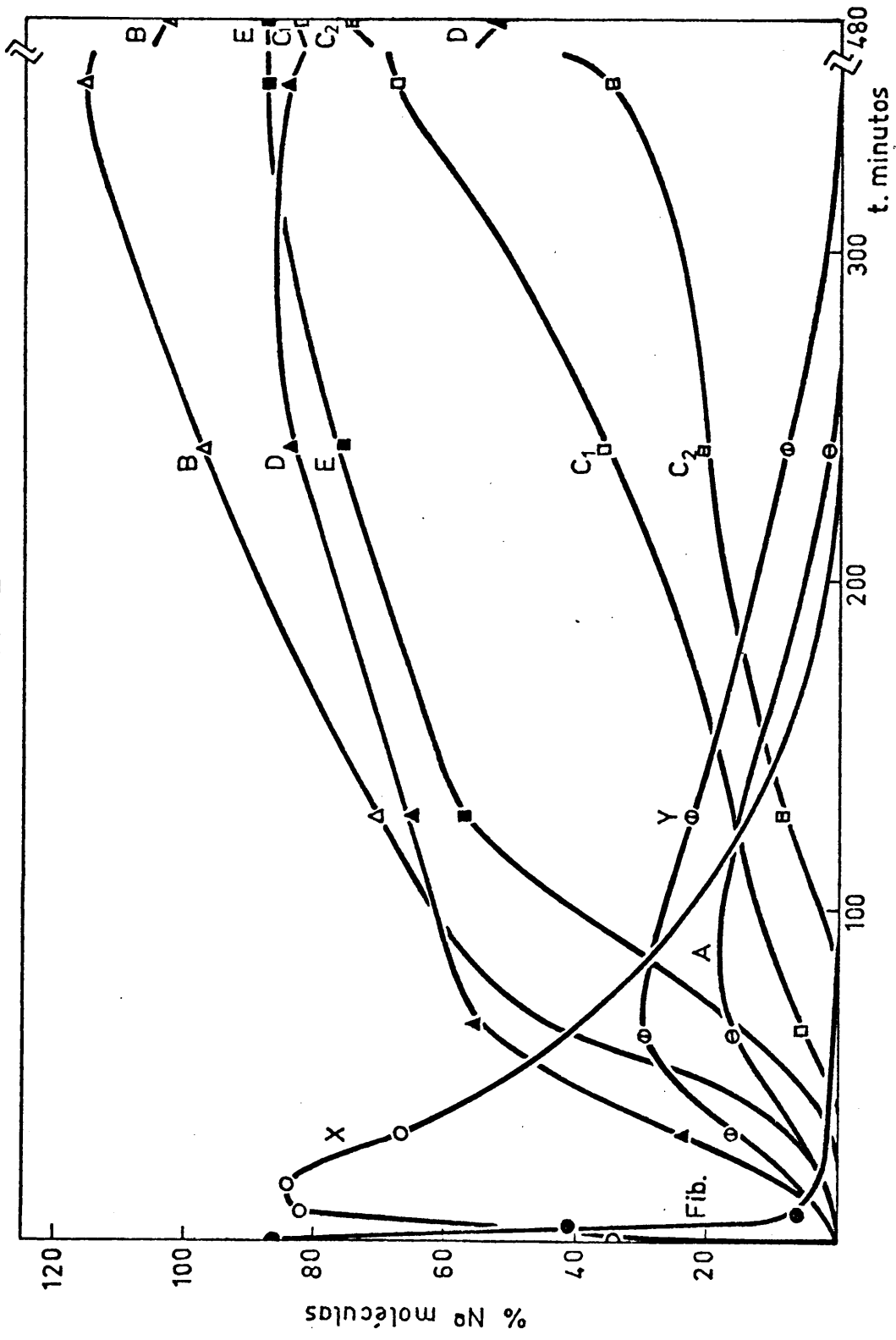
En estos experimentos se utilizaron unas relaciones de fibrina:plasmina de 250:1 y 50:1.

El número de enlaces peptídicos rotos con el tiempo de incubación se muestra en la figura 27 para el caso de 50 g de fibrina por grano de plasmina.

En primer lugar se observa claramente que en un medio con urea 3,5M, la plasmina actúa lentamente en este medio durante los primeros momentos de proteolisis. Crece rápidamente entre los 4 y los 10 minutos el número de enlaces rotos y vuelve a enlentecerse la reacción, de manera que tras 28 h de incubación con el enzima se alcanza un total de 24,5 enlaces rotos.

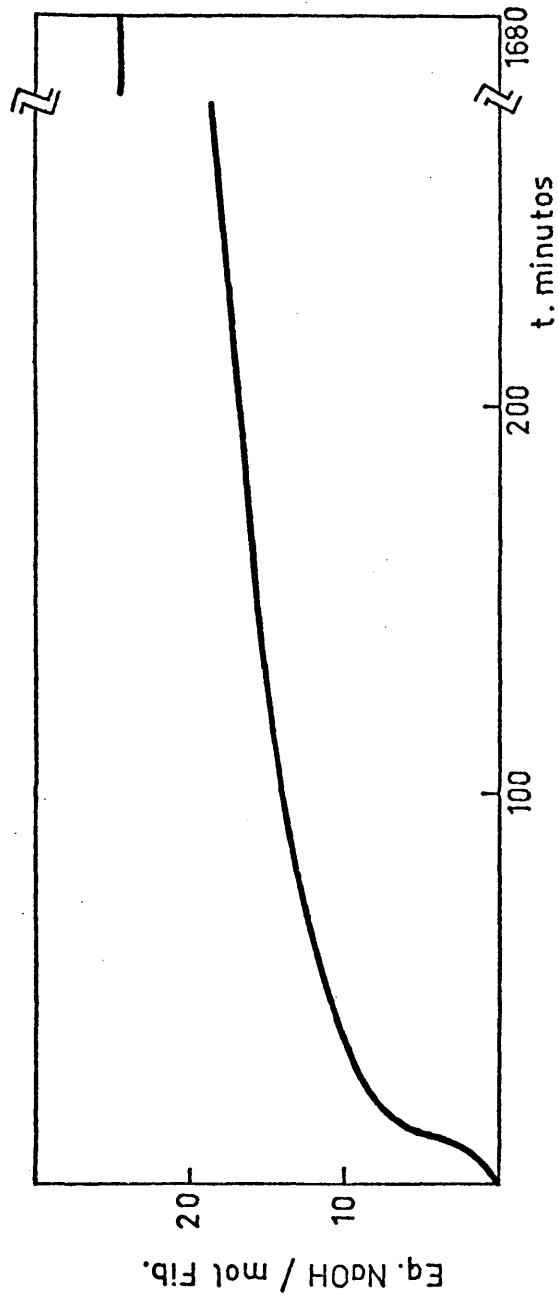
Los fragmentos presentes en las distintas etapas de proteolisis se determinaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los resultados se indican en la figura 28.

FIGURA 26



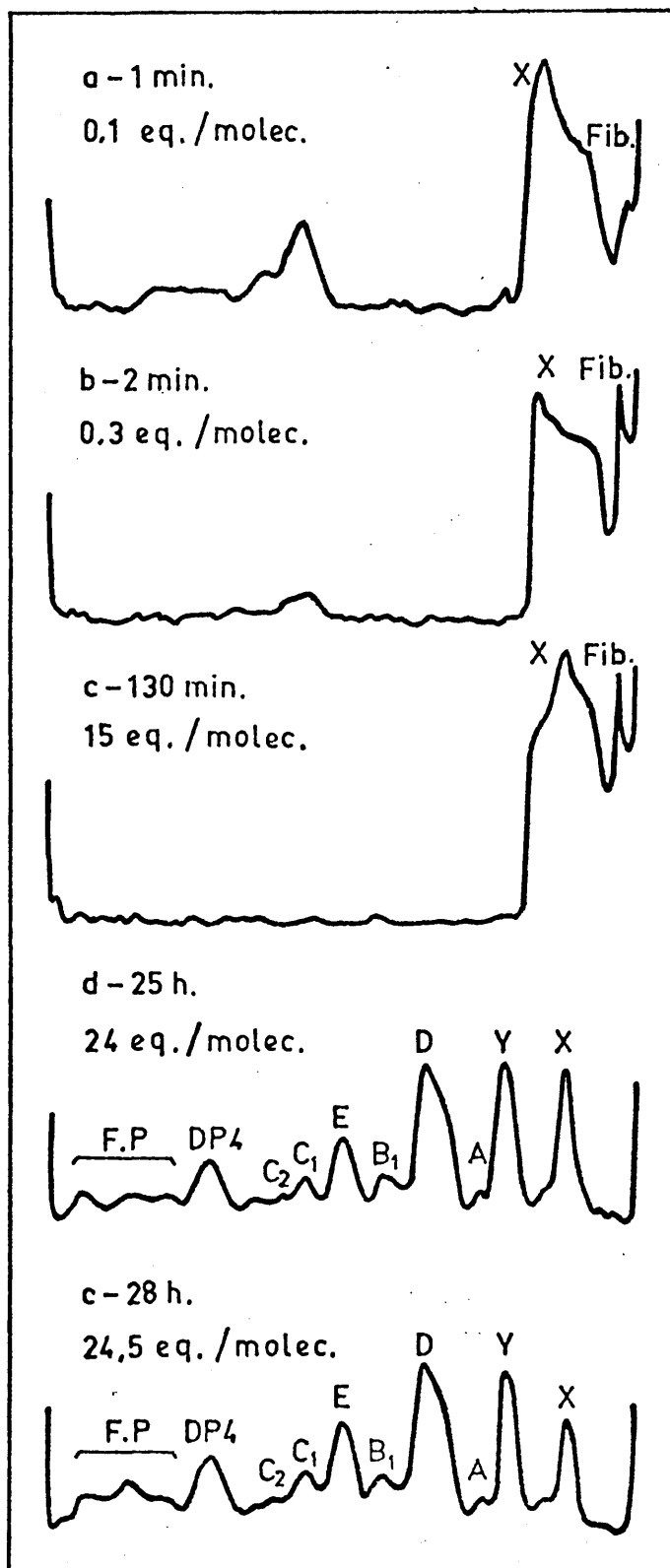
Variación con el tiempo de los productos de degradación con tripsina de la fibrina humana en urea 3,5M.

FIGURA 27



Equivalentes de NaOH por mol de proteína consumidos en la proteólisis de fibrina humana con plasmina (relación 50:1) en urea 3,5M, pH 7,5.

FIGURA 28



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de monómero de fibrina humana con plasmina (relación 250:1), urea 3,5M.

En las primeras etapas (figura 28, densitogramas a, b y c) se aprecia una banda correspondiente a restos de fibrina y otra muy ancha formada por una amplia gama de X.

Desde los primeros momentos aparecen una serie de fragmentos de masa molecular intermedia (35.000-30.000), que van disminuyendo cuantitativamente con el avance de la proteolisis hasta desaparecer.

En un estado de proteolisis correspondiente a 24 enlaces rotos, por molécula de fibrina (figura 28d), el densitograma obtenido es bastante complejo. En él están presentes las especies moleculares indicadas en la tabla IX.

A la vista de estos resultados y comparando los fragmentos obtenidos por proteolisis de fibrinógeno humano con plasmina en ausencia de urea, se ve que en este caso aparece un fragmento nuevo de masa molecular  $130.000 \pm 10\%$  comparable al fragmento A observado en las digestiones enzimáticas de fibrinógeno y fibrina humanos en urea.

Por otro lado, los fragmentos identificados como DP 1, DP 2 y DP 3 en la proteolisis con plasmina de fibrinógeno humano en ausencia y presencia de urea 3,5M y de fibrina humana en urea 3,5M, poseen una masa molecular idéntica a los denominados fragmentos B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> observados al incubar con tripsina fibrinógeno o fibrina humanos en un medio 3,5M en urea.

TABLA IX

Fragmento	Masa molecular
Trazas de X	225.000
Y	155.000
A	130.000
D temprano	100.000
D tardío	85.000
DP 1 = B <sub>1</sub>	68.000
E	48.000
DP 2 = C <sub>1</sub>	39.000
DP 3 = C <sub>2</sub>	29.000
DP 4	22.000
Familia P	( 16.000 12.500 9.500

Se puede ver comparando las figuras 28d y e que en el transcurso del tiempo disminuye el fragmento X y el de masa molecular  $16.000 \pm 10\%$  incluido en la familia P. Por otro lado, permanecen invariables Y y el fragmento de  $9.500 \pm 10\%$  Dalton, también incluido en la familia P.

El resto de los fragmentos aumenta ligeramente en estas últimas etapas consideradas.

### III.7.- PROTEOLISIS CONTROLADA DE FIBRINA ESTABILIZADA CON TRIPSINA Y PLASMINA

Estos estudios se realizaron sobre fibrina tramada en disolución y sobre coágulo de fibrina tramada. Cada una de ellas se obtuvo según el método indicado en las técnicas experimentales.

#### III.7.1.- Caracterización de la fibrina tramada en disolución

Se hicieron estudios comparativos de fibrina soluble en un medio de NaCl 0,15M, urea 2,35M, pH 6,75 con fibrina estabilizada en ese mismo medio. Para la estabilización de la fibrina se adicionó en el medio indicado cisteína 0,0125M y CaCl<sub>2</sub> 0,025M ó 0,0025M. En todos los casos se empleó una concentración de 5 mg de fibrina/ml.

Mediante experimentos de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica se estudiaron las especies moleculares que había en cada uno de los casos indicados. Se llegó a los resultados que se indican en la tabla X, en donde se ve:

1°) El fenómeno de asociación de las moléculas de fibrina está ligeramente desplazado hacia la formación de polímeros solubles de alto coeficiente de sedimentación (11,9 S equivalentes en condiciones de agua a 20°C,  $s_{20,w}^=$  17,5 S), cuando el pH del medio es 6,75, con relación a

TABLA X

Condiciones Experimentales	Muestra	Coeficientes de sedimentación y % de especies moleculares obtenidas		
NaCl 0,15M-Urea 2,35M pH 7,5	Fibrinógeno	5,5 S		
	Fibrina soluble (no estabilizada)	6,1 S (39%)	8,6 S (8%)	11,5 S (53%)
NaCl 0,15M-Urea 2,35M pH 6,75	Fibrina soluble (no estabilizada)	6,0 S (33%)		11,9 S (67%)
	Fibrina parcialmente estabilizada (A)	6,0 S (21%)	7-10 S (4%)	12,4 S (79%)
NaCl 0,15M-Urea 2,35M CaCl <sub>2</sub> 2,5mM-pH 6,75	Fibrina parcialmente estabilizada (A)	5,7 S (64%)		12,4 S (32%)
	Fibrina parcialmente estabilizada (B)	5,5 S (93%)	7,4 S (7%)	9,6 S (trazas)
NaCl 0,15M-Urea 3,5M pH 7,5	Fibrinógeno	4,5 S		
	Fibrina soluble (no estabilizada)	4,6 S (100%)		
	Fibrina parcialmente estabilizada (A) tras dializar.	4,4 S (96%)	6,2 S (trazas)	7,5 S (4%)
NaCl 0,15M-Urea 3,5M pH 7,5		4,5 S (79%)	6,4 S (5%)	11,0 S (16%)

pH 7,5.

2°) Al añadir cisteína 0,0125M y  $\text{CaCl}_2$  0,025M al medio anterior, ocurre un desplazamiento del equilibrio en sentido contrario, de forma que casi la totalidad del material (un 93%) pasa al estado de monómero y el bajo porcentaje restante está formando agregados de fibrina de muy bajo coeficiente de sedimentación ( $7,4 \text{ S}$  o  $s_{20,w} = 10,9 \text{ S}$ ).

3°) Cuando la concentración de cisteína añadida es la misma, pero el  $\text{CaCl}_2$  sólo está en una concentración 0,0025M, se observa mayor proporción de monómero (64%) con relación a los porcentajes obtenidos para la fibrina soluble (33%) en ausencia de iones  $\text{Ca}^{++}$ , pero el material restante está en forma de agregados de fibrina: un 32% con un coeficiente de sedimentación de  $12,4 \text{ S}$  ( $s_{20,w} = 18,2 \text{ S}$ ) y casi un 4% con un tamaño algo menor.

El material estabilizado con  $\text{CaCl}_2$  0,0025M se dializó exhaustivamente frente a  $\text{NaCl}$  0,15M, urea 3,5M, pH 7,5, manteniéndose la misma concentración de proteína.

Por experimentos anteriores sobre fibrina soluble se conoce que en este medio prácticamente toda la proteína pasa al estado de monómero. Para conocer lo ocurrido en este caso, el material se sometió nuevamente a experimentos de velocidad de sedimentación.

Como se ve en la tabla X (última línea), sólo una

parte de la fibrina que estaba formando agregados, pasa al estado de monómero. El resto queda formando polímeros de distinto tamaño: un 5% posee un coeficiente de sedimentación de 6,4 S ( $s_{20,w}=11,6$  S) y un 16% forma un agregado de 11 S ( $s_{20,w}=19,9$  S), lo cual indica que en estas condiciones se ha producido una estabilización parcial de polímero de fibrina.

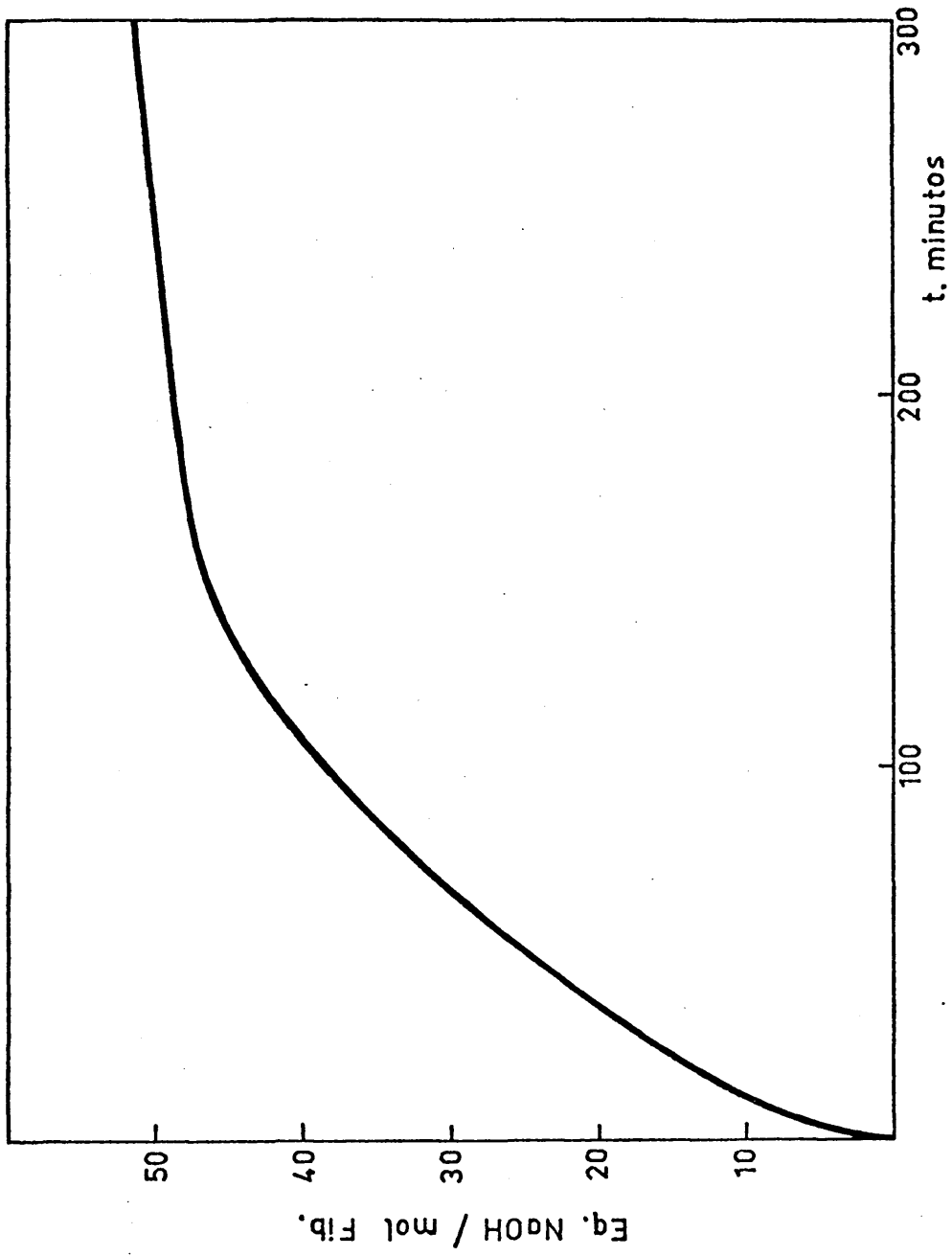
### III.7.2.- Estudios cinéticos con tripsina sobre polímero intermedio de fibrina tramada en urea 3,5M

Como se ve en la figura 29, la rotura de enlaces peptídicos por acción de la tripsina ocurre de una forma continua a lo largo del tiempo hasta un tiempo de incubación de 300 minutos.

Comparando estos resultados con los obtenidos para el monómero de fibrina (figura 23) se ve que ambos procesos ocurren de forma semejante, aunque el número de enlaces rotos es ligeramente mayor a lo largo de toda la proteólisis en el caso de la fibrina tramada, en que se llega a un total de 52 enlaces rotos por molécula de fibrina inicial.

Una vez eliminada totalmente la urea de las distintas muestras, se determinó la cantidad de material que permanece en estado soluble, puesto que en las muestras correspondientes a los 2 primeros minutos de proteólisis

FIGURA 29



Equivalentes de NaOH por mol de protefina consumidos en la protelisis de fibrina parcialmente tramada con tripsina (relación 500:1), urea 3,5M.

con tripsina (4 enlaces/molécula rotos), se obtuvo un coágulo y en las etapas siguientes se produjo un precipitado que apenas fué perceptible a los 16 minutos de incubación con el enzima (12 enlaces/molécula rotos).

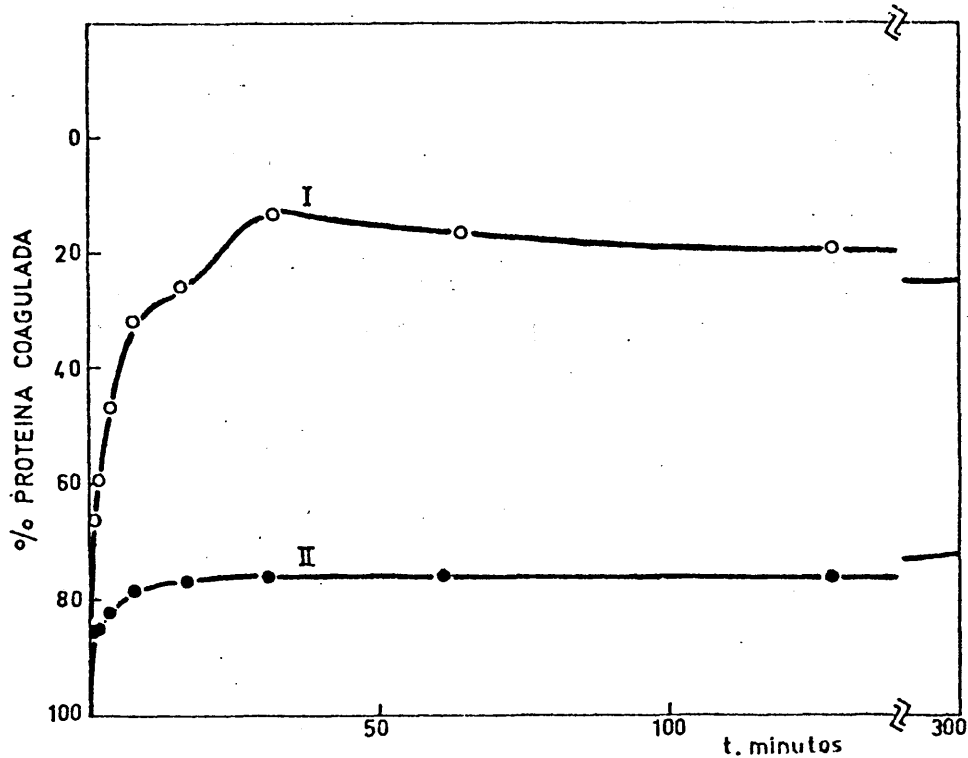
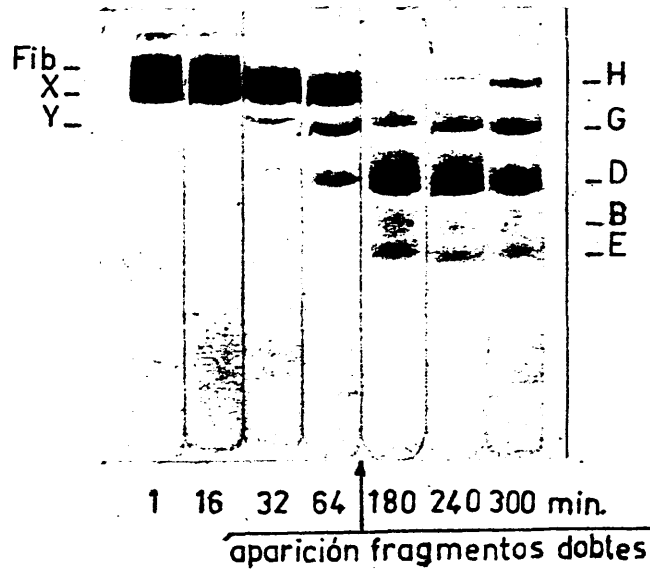
Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30 curva I, donde se observa también que a los 32 minutos de proteólisis se alcanza una situación con un 86% de material soluble no dializable, que coincide con la ruptura de unos 18 enlaces peptídicos por molécula original. A partir de este momento, la cantidad de especies moleculares solubles de elevada masa molecular va disminuyendo, hasta llegar a un 75% de material no dializable, como en el caso del monómero de fibrina.

El material soluble libre de urea, resultado de la digestión con tripsina, se sometió a 57°C durante 30 min.

Las cantidades de material termoestable en cada caso se muestran en la figura 30 curva II, que indica una cinética de aparición diferente a la obtenida para el caso del fibrinógeno humano en ausencia de urea (figura 7).

Con fibrina se aprecia un rápido incremento en el material termoestable no dializable desde los primeros minutos de la acción triptica. A los 16 minutos de incubación con el enzima se llega a un estado en que la cantidad de material permanece invariablemente en un 23-24% del material inicial, hasta que transcurridos los 180 minutos

FIGURA 30



I.- Proteolisis de fibrina parcialmente tramada: tripsina=500:1 en urea 3,5M (en la parte superior, los distintos fragmentos obtenidos a lo largo del tiempo). II.- Incubación a 57°C, 30 min, tras la eliminación de la urea del medio.

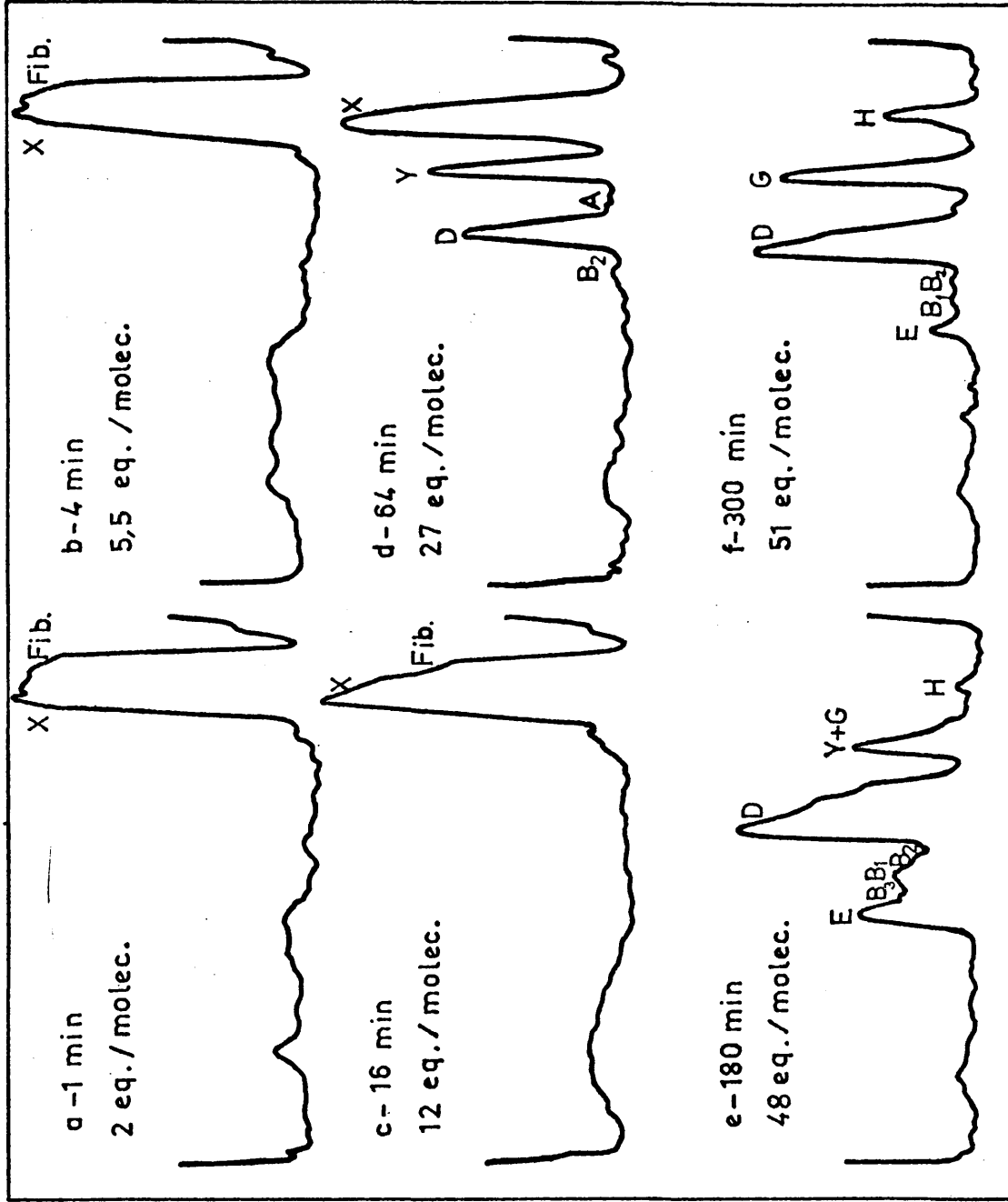
iniciales de digestión enzimática empieza a aumentar. A los 300 minutos del tratamiento con tripsina se ha perdido por diálisis un 25% del material inicial, como se puede deducir a partir de la curva I. Por tanto, en esta etapa de digestión se ha producido un 52-53% de material termosoluble. Esta proporción es comparable a la obtenida para el fibrinógeno tratado con tripsina en ausencia de urea (47-48%).

Se sometieron a electroforesis una serie de muestras de proteolisis incubadas durante tiempos crecientes con tripsina. Los resultados obtenidos, que vienen indicados en la figura 31, podemos resumirlos en la tabla XI.

Se observa que los fragmentos Y y D empiezan a formarse cuando hay 12 enlaces rotos por molécula de fibrina (figura 31c) siendo el E ligeramente apreciable cuando se han producido 27 roturas en la molécula inicial (figura 31e). También en esta etapa aparecen los fragmentos A y B<sub>2</sub>. Estos resultados son comparables a los obtenidos para el monómero de fibrina, pero no para el fibrinógeno en urea 3,5M, con el que el número de enlaces rotos para situaciones comparables es mayor en 4 ó 5 enlaces.

En el estado en que se han proteolizado 48 enlaces de la molécula de fibrina por acción de la tripsina (figura 31e), el fragmento D que antes formaba un pico homogéneo de  $100.000 \pm 10\%$ , se desdobra, en parte, en fragmentos D

FIGURA 31



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrina parcialmente tramada con tripsina (relación 500:1), urea 3,5M.

TABLA XI

Fragmento	Masa molecular		
	Fase de coágulo consistente	Fase de degradación del coágulo	Fase de material soluble
(Fibrina) <sub>n</sub>	(330.000) <sub>n</sub>	(330.000) <sub>n</sub> (trazas)	
Fibrina	330.000	330.000 (trazas)	
X	(300.000 240.000)	(295.000 220.000)	(260.000 220.000) (trazas)
H			238.000
G			200.000
Y		170.000	170.000
A			130.000
D temprano			100.000
D tardío			85.000
B <sub>2</sub>			75.000
B <sub>1</sub>			65.000
B <sub>3</sub>			52.000
E			45.000

de 80.000<sup>±</sup>10%, al igual que para el monómero de fibrina.

En estas condiciones se forman tres tipos de fragmentos de masa molecular intermedia entre el D y el E; los que llamamos B<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> son comparables en movilidad a los observados en la digestión trípica del fibrinógeno en urea 3,5M y en el caso del monómero de fibrina (en el que sólo

se distingue el B<sub>1</sub>). Un nuevo fragmento de mayor movilidad aunque inferior a la del E se ha denominado B<sub>3</sub>.

En esta misma etapa de digestión enzimática, una vez degradado todo el fragmento X, se hace evidente un nuevo fragmento de  $238.000 \pm 10\%$  de masa molecular y que denominamos H, que va creciendo a partir de este momento hasta el estado de 51 enlaces rotos/molécula de fibrina (figura 31f) en que se suspendió el estudio, y otro en cantidades comparables, de masa molecular 200.000 llamado G, que tiende a desaparecer.

Por otro lado, es de destacar que en este caso no son apreciables, en ninguna etapa, los fragmentos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, observados en los otros casos de proteólisis en urea 3,5M.

Además de los indicados en la tabla XI, aparecen una serie de productos de digestión de baja masa molecular, desde los primeros momentos de proteólisis, que van disminuyendo en cantidad y tamaño con el avance del ataque enzimático, habiéndose degradado casi totalmente en el estado de 48 enlaces rotos por molécula de fibrina inicial (figura 31 a-e).

A partir del área de cada uno de los picos de los densitogramas a los distintos tiempos y de la masa molecular de cada uno de los fragmentos se obtuvieron unos resultados que sugieren la superposición de dos procesos de degradación distinta, ya que las poblaciones moleculares

iniciales también lo son. Por una parte existe la fibrina no tramada monomérica y por otra, los polímeros de fibrina estabilizada, que dan lugar a las nuevas especies moleculares, con los fragmentos  $\beta$ , que no se habían formado en proteólisis anteriores, y aparece a los 180 minutos de digestión llegando a ser un 7,5% del total, y el G que llega hasta un 5%.

### III.7.3.- Estudios sobre coágulo de fibrina insoluble en urea 8M

Una vez obtenido el coágulo de fibrina insoluble como se ha indicado en las técnicas experimentales y eliminadas las moléculas de fibrina no tramada por suspensión en urea 8M, se sometió a la acción enzimática tras lavarlo y trocearlo cuidadosamente.

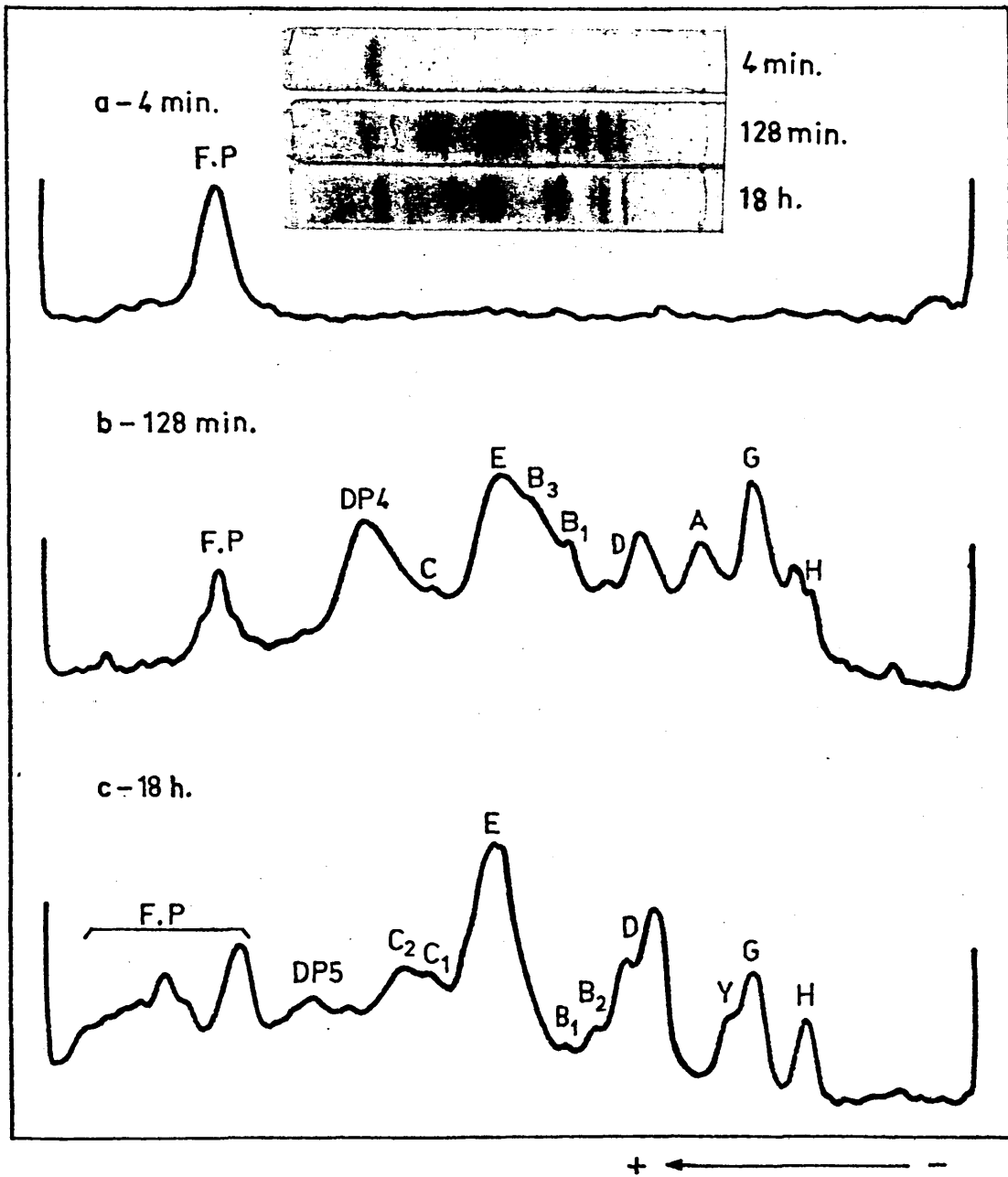
#### III.7.3.1.- Proteólisis con tripsina

Se usó una relación de fibrina:tripsina de 100:1 y la proteólisis se realizó a una temperatura de 23,5-25°C.

Se siguieron las distintas etapas de proteólisis mediante EGPA de muestras sometidas a distintos tiempos de incubación con tripsina. Los resultados quedan reflejados en la figura 32.

Se apreciaron claramente tres etapas. La primera correspondiente a tiempos de digestión muy cortos (figura 32a) y en ella se aprecia solamente una especie molecular

FIGURA 32



Perfiles electroforéticos de los productos de proteolisis de fibrina tramada con tripsina (relación 100:1).

TABLA XII

Fragmento	Masa molecular		
	Etapa inicial	Etapa intermedia	Etapa final
X o H		(250.000 230.000	240.000
G		180.000	180.000
Y			160.000
A		135.000	
D <sub>1</sub>			108.000
D		(100.000 85.000	92.000
B <sub>2</sub>			79.000
B <sub>1</sub>		67.000	67.000
B <sub>3</sub>		60.000	60.000
E		46.000	46.000
C <sub>1</sub>			35.000
C <sub>2</sub>		32.000	29.000
DP4		23.000	22.000
DP5			18.000
Familia P	11.000	11.000	(12.500 9.500
			5.700

de  $11.000 \pm 10\%$ .

En la segunda etapa que va desde los pocos minutos de digestión hasta varias horas (figura 32b), los resulta

dos son mucho más complejos, existiendo los fragmentos que se detallan en la tabla XII.

Por último, una vez transcurridas varias horas de proteólisis con tripsina, la distribución de bandas electroforéticas sigue siendo compleja, pero ligeramente modificada con relación al estado anterior. Los resultados obtenidos se muestran también en la tabla XII.

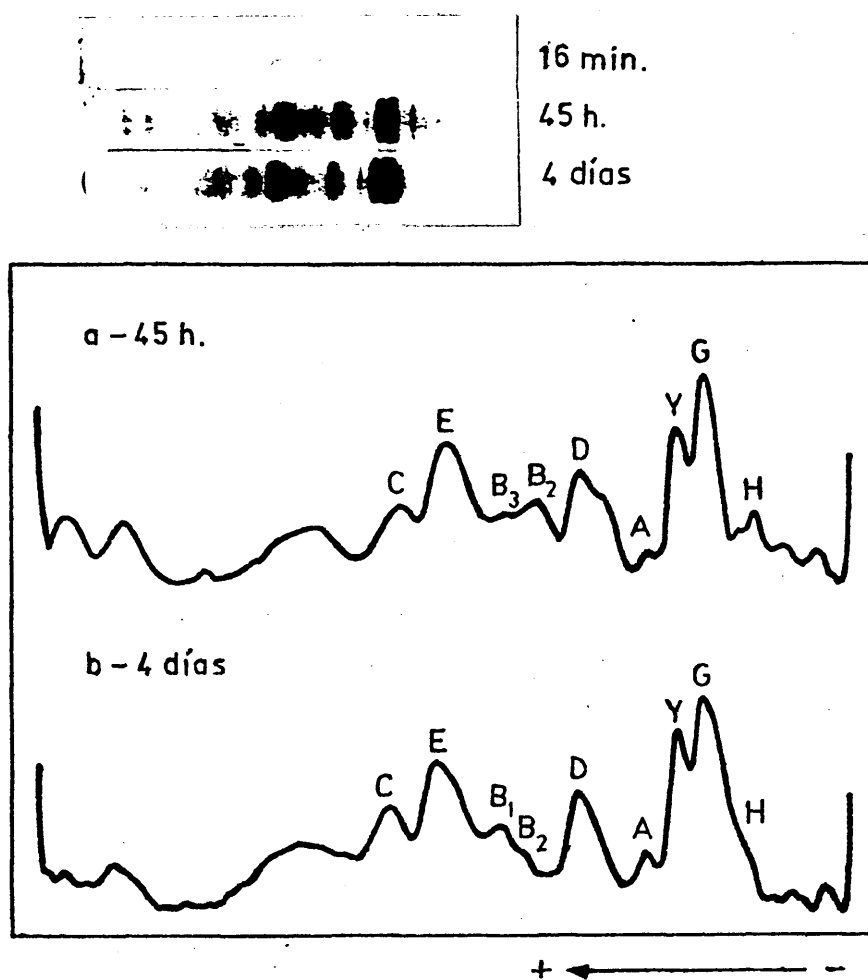
#### III.7.3.2.- Proteólisis con plasmina

Se empleó una relación de fibrinógeno:plasmina de 75:1 y se mantuvo la temperatura de la mezcla de reacción en 23,5-25°C. El método seguido fué semejante al empleado en el caso de proteólisis con tripsina: Se sacaron diversas muestras a distintos tiempos de digestión enzimática y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida.

No se detectaron fragmentos durante las 4 primeras horas de digestión plásmica, posiblemente por estar éstos en una concentración muy baja. Prolongando la reacción durante bastantes horas, se obtuvieron los resultados que se especifican en la figura 33.

En los densitogramas se obtiene una distribución de picos bastante compleja, a las 45 horas de proteólisis (figura 33a), habiéndose simplificado ligeramente después de prolongar durante 4 días la digestión enzimática (figura 33b).

FIGURA 33



Perfiles electroforéticos de los productos de proteólisis de fibrina tramada con plasmina (relación 75:1)

TABLA XIII

Fragmento	Masa molecular	
	45 h 30 min	4 días
	340.000	340.000
	280.000	290.000
H	260.000	
G'	210.000	210.000
G	180.000	180.000
Y	150.000	150.000
A	130.000	130.000
D	(100.000 (temp.) 88.000 (tard.))	93.000
B <sub>2</sub>	72.000	73.000
B <sub>1</sub>		63.000
B <sub>3</sub>	58.000	
E	45.000	45.000
C	33.000	34.000
	(26.000 12.000)	(30.000 14.000)
	6.500	8.000
	5.500	6.000

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla

XIII.

Comparando los densitogramas a y b de la figura 33,

se observa que los fragmentos de masas moleculares  $340.000 \pm 10\%$ ,  $290.000 \pm 10\%$ ,  $260.000 \pm 10\%$ ,  $73.000 \pm 10\%$  y  $5.500 \pm 10\%$  disminuyen o incluso desaparecen a lo largo del tiempo.

Por otra parte, el fragmento D se ve claramente constituido por dos familias de distinta masa molecular a las 45 h de digestión enzimática y, sin embargo, está formando un pico homogéneo a los 4 días de incubación con el enzima.

### III.8.- ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LOS FRAGMENTOS DE MASA MOLECULAR ELEVADA OBTENIDOS EN LAS ETAPAS INICIALES DE DIGESTION ENZIMATICA

Empleando una relación de fibrinógeno:tripsina de 1000:1 en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (véase figura 7), se paralizó la reacción a los 3, 4 y 20 minutos.

En la etapa de 3 minutos de proteólisis, el fragmento con capacidad de coagular espontáneamente alcanza una concentración máxima (46% del total de fibrinógeno inicial). En la parte sobrenadante además de fibrinógeno aún no atacado que coagula con trombina y algunos fragmentos peptídicos de baja masa molecular, no se observan cantidades apreciables de fragmento X tardío.

En la etapa de 20 minutos ya se ha perdido la capacidad de producir un coágulo consistente, aunque todavía

se obtiene un pequeño precipitado. Por otra parte, prácticamente todo el fibrinógeno ha sido proteolizado, puesto que el sobrenadante no coagula con trombina, encontrándose fragmentos X de alta movilidad en una proporción elevada, aunque no se han producido todavía fragmentos Y, D o E.

En cada una de estas etapas se estudiaron los fragmentos X con capacidad de coagulación espontánea y los fragmentos X que ya han perdido esa propiedad.

### III.8.1.- Estudio de las masas moleculares de las cadenas constituyentes

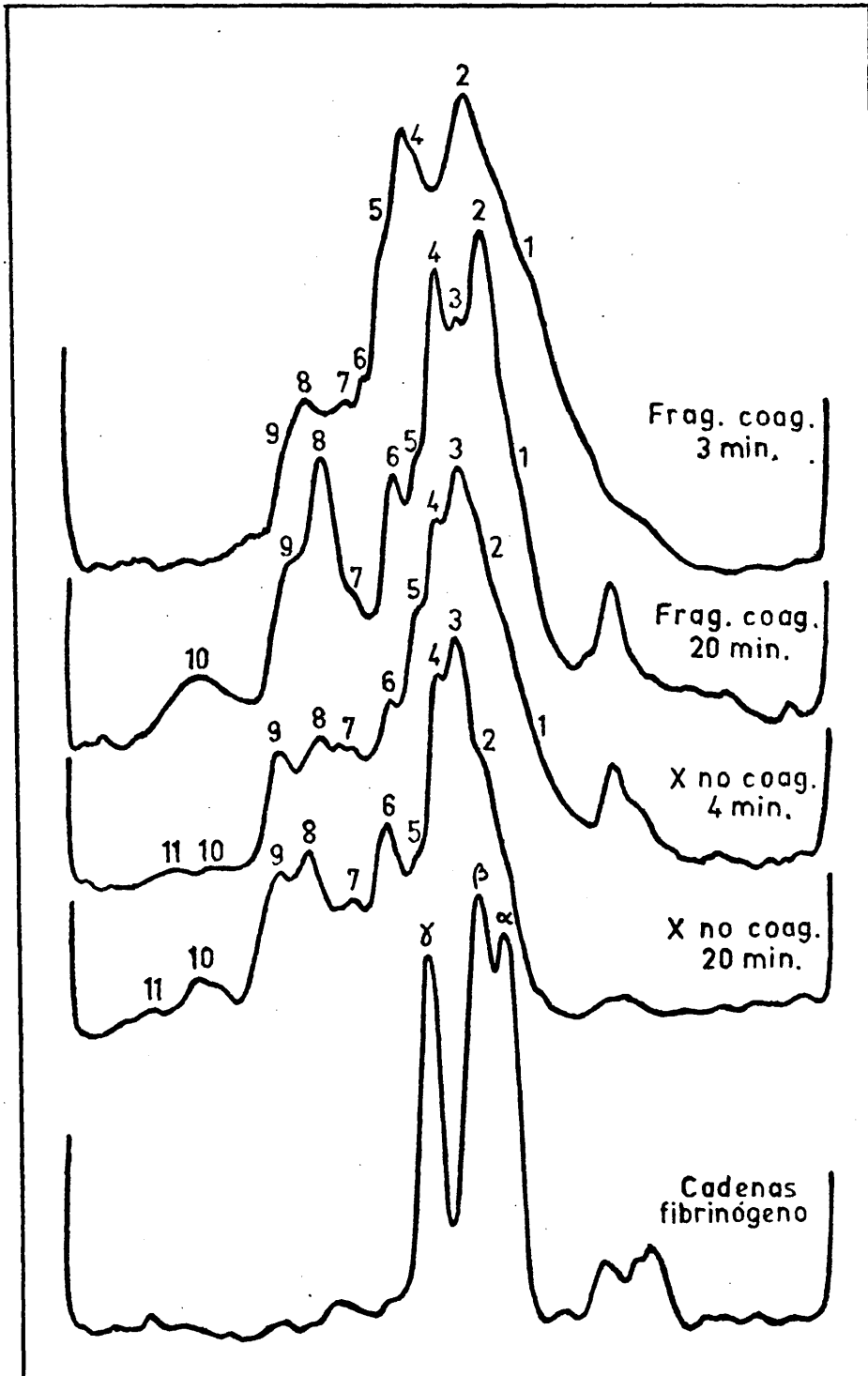
En la etapa de 3 minutos de digestión triptica por reducción y carboximetilación del fragmento coagulado por la tripsina, se separaron sus cadenas constituyentes, que se sometieron a EGPA en presencia de SDS.

A partir de los densitogramas de los geles de poli acrilamida (figura 34), en virtud de la movilidad relativa exhibida por cada especie, se pudo calcular la masa molecular aproximada.

Del mismo modo, a partir del área limitada por cada pico, se calculó el porcentaje en peso de cada una de las cadenas o fragmentos de cadenas que integran la especie coagulada por tripsina (tabla XIV columna 1<sup>a</sup>).

En la etapa de 4 minutos de digestión triptica, se

FIGURA 34



Perfiles electroforéticos de las cadenas resultantes tras reducción total y carboximetilación del fibrinógeno y de los fragmentos X obtenidos por incubación con tripsina.

**TABLA XIV**

3 min.	4 min.		20 min.		Banda
	Fragmento con capacidad coagulante	Fragmento X no coagulable	Fragmento con capacidad coagulante	Fragmento X no coagulable	
120.000 (5%)	210.000 (2,2%) 120.000 (13,8%)	110.000 (5,6%) 93.000 (1,5%)	110.000 (4,5%) 95.000 (4,4%)	110.000 (2%)	(0)
75.000 (21,2%)	75.000 (16,5%)	76.000 (4,9%)	70.000 (10,8%)		(1)
58.000 (29,9%)	58.000 (32%)	58.000 (18,1%)	58.000 (19,4%)	58.000 (15,5%)	(2)
47.000 (19,7%)	47.000 (19,9%)	50.000 (14,9%)	50.000 (6,9%)	50.000 (17,1%)	(3)
38.000 (6,3%)	40.000 (5,3%)	44.000 (15,7%)	44.000 (12,8%)	47.000 (15,5%)	(4)
36.000 (5,4%)	36.000 (3,4%)	40.000 (6,9%)	41.000 (5%)	40.000 (6,3%)	(5)
33.000 (5,1%)	32.000 (1,7%)	33.000 (8,8%)	36.000 (6,7%)	35.000 (11,7%)	(6)
27.000 (4,4%)	28.000 (2,2%)	28.000 (7,5%)	31.000 (6,2%)	27.000 (8%)	(7)
25.000 (3%)	24.000 (3%)	24.000 (8,1%)	26.000 (11%)	23.000 (11%)	(8)
		19.000 (6%)	22.000 (6,5%)	20.000 (7,7%)	(9)
		14.000 (1,1%)	14.000 (5,7%)	13.000 (1,4%)	(10)
		11.000 (0,9%)		11.000 (1,4%)	(11)

estudiaron dos tipos de fragmentos, los que han coagulado espontáneamente por acción de la tripsina y el fragmento X que ya no es coagulable por trombina. Haciendo para ellos el mismo tipo de determinaciones que en el caso anterior, se llegaron a los resultados que se indican en la tabla XIV columnas 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>.

Por último, para la etapa de 20 minutos de digestión enzimática se estudiaron las cadenas constituyentes de los fragmentos que constituyen el precipitado observado por acción de la tripsina (minoritarios en este caso) y del fragmento X no coagulable (figura 39), llegando a los resultados expresados en la tabla XIV columnas 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>.

Hay que señalar que:

1°.- El material de baja movilidad observado después de la reducción y carboximetilación, que corresponde a especies de masas moleculares superiores a la de las cadenas  $\alpha$  (75.000) (bandas 0) en estas condiciones, deben ser productos no reducidos totalmente o reoxidados durante la carboximetilación, y sólo introducen un margen de incertidumbre que, salvo en un caso, no pasa del 10% del total en los porcentajes relativos de las bandas con movilidades iguales a las de las cadenas del fibrinógeno intactas o degradadas.

2°.- El material que coagula conserva en parte la presencia de cadenas  $\alpha$  intactas (banda (1), que disminu-

yen en proporción a medida que aumenta el tiempo de la proteólisis.

3°.- La banda (2) corresponde en movilidad a las cadenas  $\beta$ .

4°.- Esta banda al aumentar la acción proteolítica disminuye en intensidad apareciendo una banda intermedia que es la (3) con movilidad inferior a la de las cadenas  $\gamma$  e intactas.

5°.- La banda (4) corresponde a las cadenas  $\gamma$ .

6°.- El material que no coagula, además de no tener prácticamente la banda correspondiente a las cadenas  $\alpha$  (excepto en la muestra de 4 min no coagulable, que puede tener trazas: =4,5%), presenta una degradación de las cadenas  $\beta$  (banda (2)), con un fuerte aumento de la banda (3). Esta banda (3) se observa también claramente incluso en el material que coagula después de una incubación de 20 min.

### III.8.2.- Estudio de los aminoácidos N-terminales

Estudios comparativos de N-terminales con respecto al fibrinógeno original utilizado y a la fibrina obtenida por incubación con trombina, muestran que en el caso del material coagulado espontáneamente después de 3 minutos de incubación con tripsina, los aminoácidos terminales claramente mayoritarios siguen siendo como en el caso de la fi

brina Tyr y Gly, si bien aparecen también, aunque en menor proporción, otros aminoácidos N-terminales como Ala, Met, Leu y posiblemente Val y Pro (figura 35a).

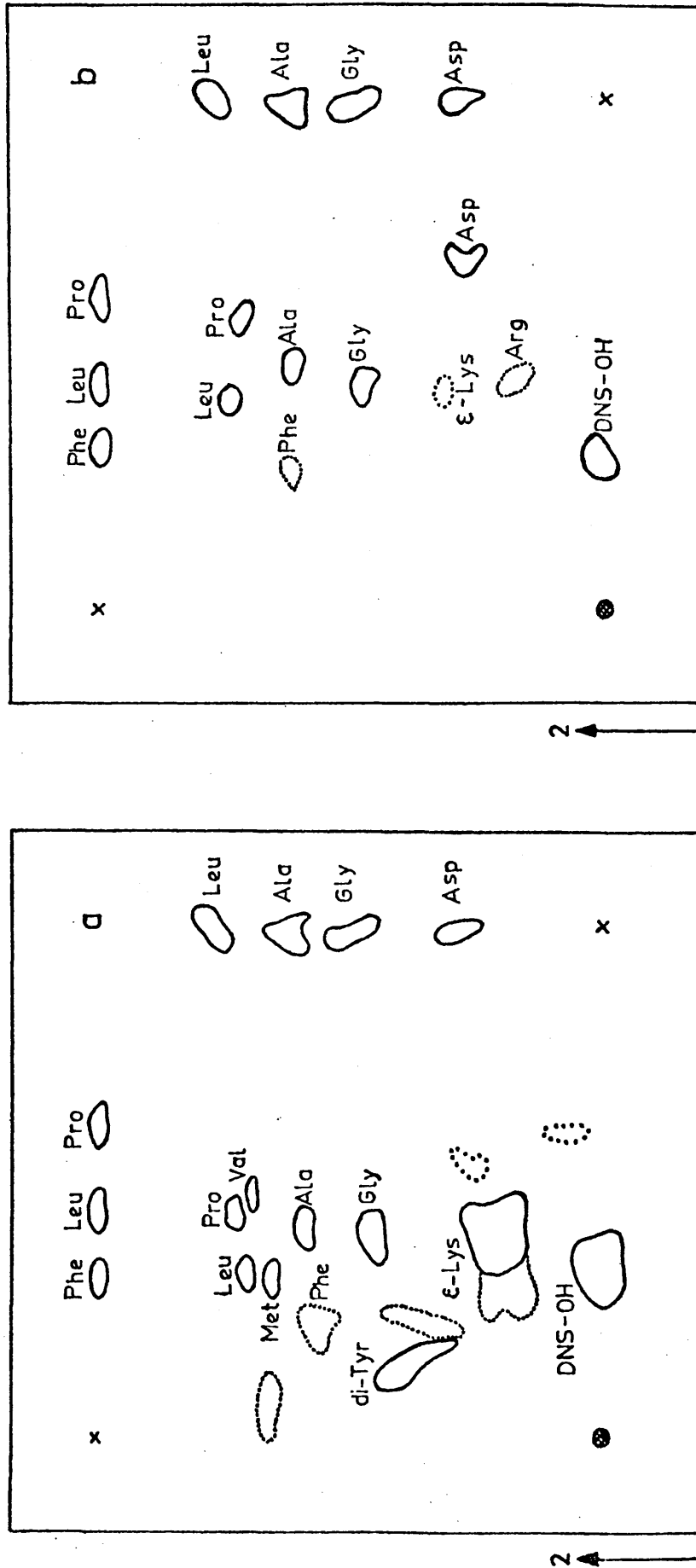
En el caso del material coagulado por incubación con tripsina durante 4 minutos (figura 35b), muestra un resultado parecido al del caso anterior con dos excepciones importantes, la Tyr ha desaparecido prácticamente y se detecta la presencia de Arg.

### III.9.- ESTUDIO DE PEPTIDOS DE BAJA MASA MOLECULAR MEDIANTE ANALISIS BIDIMENSIONAL POR CROMATOGRAFIA Y ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

Por este método se estudiaron los péptidos de baja masa molecular obtenidos a partir de fibrinógeno humano en los diversos estados de proteólisis trípica indicados en el capítulo anterior; es decir, de 3, 4 y 20 minutos, para una relación de proteína:enzima 1000:1, en ausencia de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico.

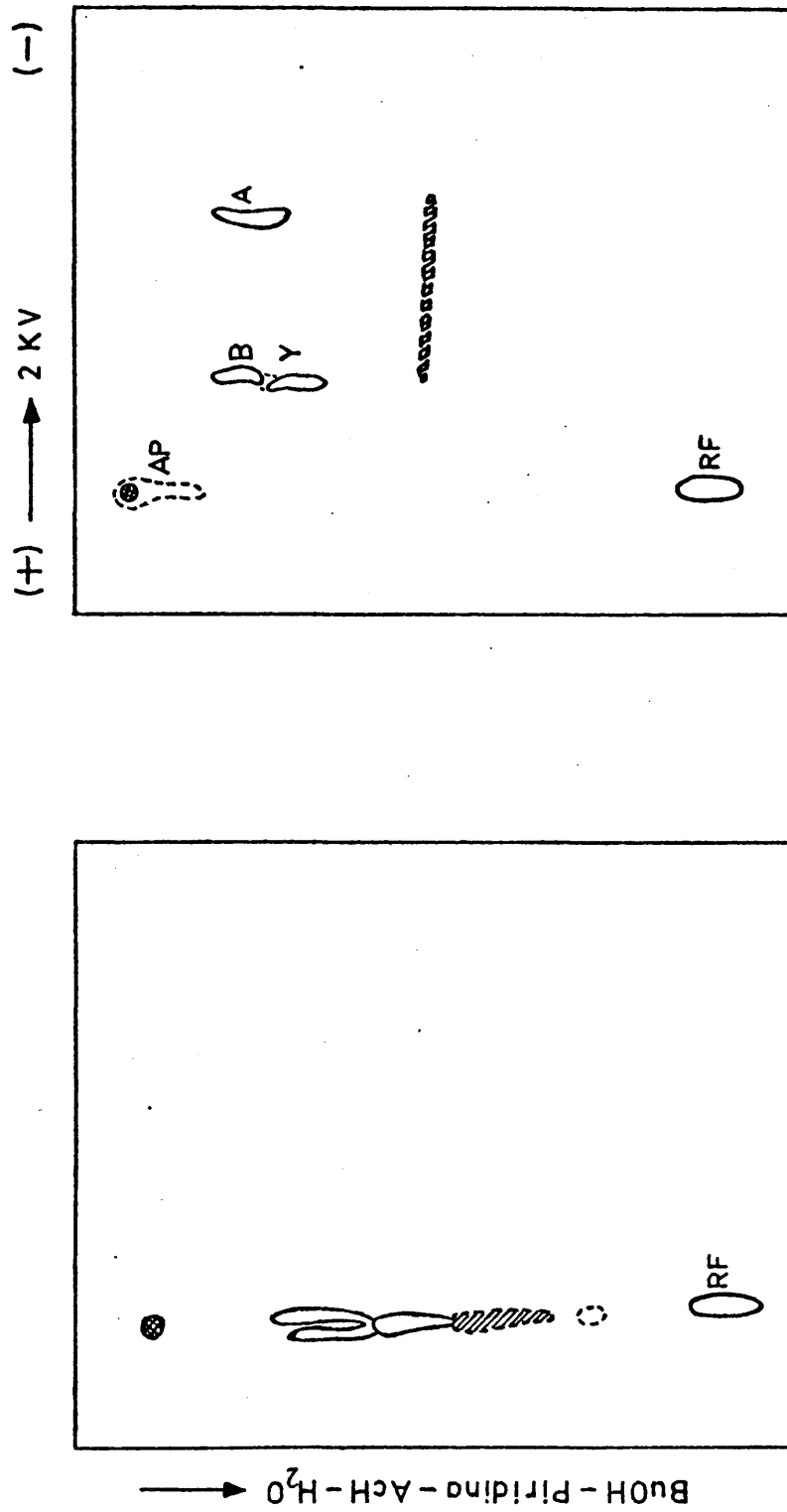
En primer lugar, se realizaron mapas peptídicos de fibrinopéptidos obtenidos a partir de fibrinógeno humano, por acción de la trombina. Los resultados obtenidos se indican en la figura 36, donde se han podido identificar los fibrinopéptidos A, B e Y y probablemente el A P (32). Los fibrinopéptidos A, B e Y presentan una solubilidad muy semejante en el solvente empleado para cromatografía,

FIGURA 35



Aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminales del material coagulado por incubación con tripsina (2000:1). a-Fragmento obtenido a los 3 min.; b- Fragmento obtenidos a los 4 min.

FIGURA 36



Mapa peptídico del material soluble después de incubar fibrinógeno con trombina.  
(La mancha rayada presenta coloración amarilla. R.F.: rojo fenol).

sin embargo, el A por estar más cargado positivamente (32) sufre el mayor desplazamiento en la electroforesis hacia el cátodo. El fibrinopéptido B se identifica por su tinción específica por el método de Sakaguchi (137), aunque por su carga y movilidad sale muy próximo al fibrinopéptido Y con el cual podría confundirse.

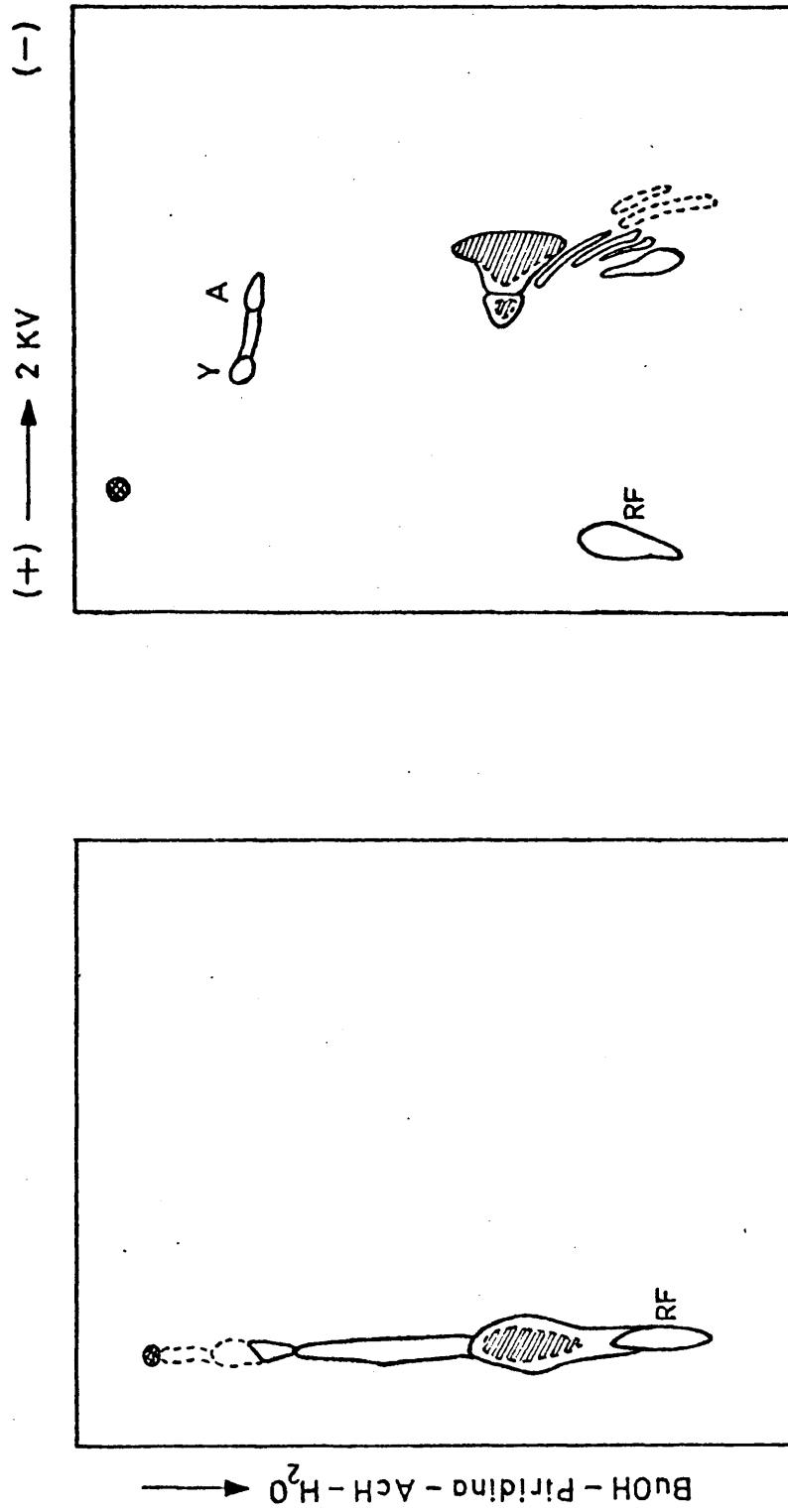
Además se observó una mancha de tinción más débil, apenas desplazada del punto de aplicación y que puede ser el fibrinopéptido AP, ya que en las condiciones en que se ha realizado la electroforesis (pH 3,6) la carga neta de este fibrinopéptido debe ser muy próxima a la neutralidad.

Por cromatografía descendente en papel y análisis bidimensional del material de baja masa molecular presente a los 3 minutos de proteólisis, para la relación indicada de proteína:enzima, se llega a los resultados que se indican en la figura 37.

Aparecen dos manchas unidas por una cola que coinciden en posición y color con las identificadas como fibrinopéptido A la superior y B+Y la inferior.

Por otro lado, existe una familia de péptidos con una alta solubilidad en la mezcla empleada para cromatografía y con carga neta positiva a pH 3,6, ya que presentan un apreciable desplazamiento hacia el cátodo (138). Se identifican claramente hasta seis péptidos y otros dos no tan abundantes. Una de las manchas mayores presenta co

FIGURA 37



Mapa peptídico del material soluble después de incubar fibrinógeno con tripsina (1000:1) durante 3 min. y precipitar con TCA 10%. (La región rayada presenta coloración amarilla. R.F.: rojo fenol).

loración amarilla que está relacionada con la existencia de prolina.

En la situación de 4 minutos de acción triptica (figura 38) aparecen manchas correspondientes en posición y color a los fibrinopéptidos A y B+Y, más intensas que a los 3 minutos.

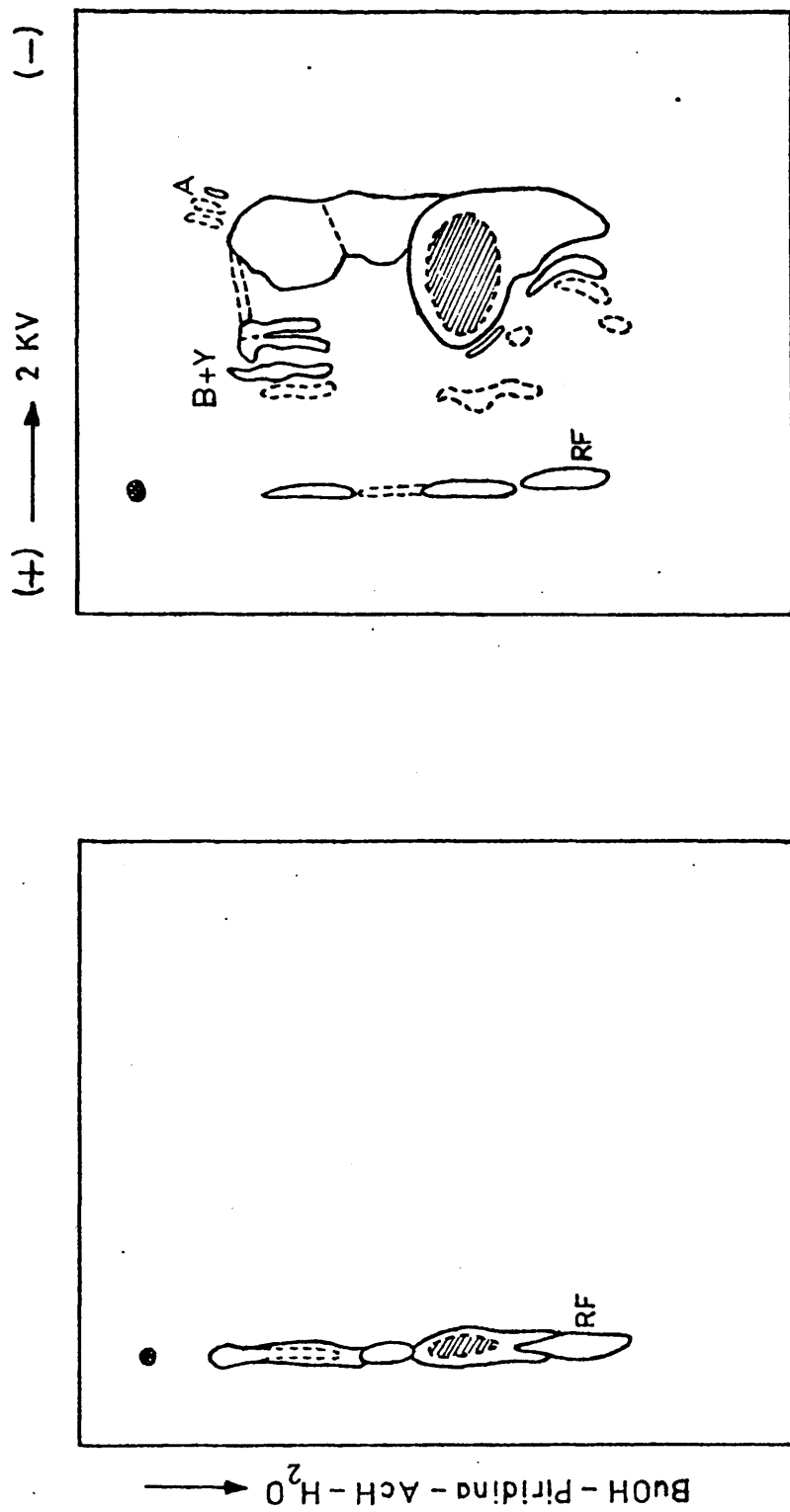
Siguen apareciendo péptidos cargados muy positivamente correspondientes a los observados en la etapa anterior y dos manchas grandes, una de las cuales engloba el péptido A, aunque se aprecian nuevos fragmentos menos solubles en BuOH - Pyr - ACh - H<sub>2</sub>O y con carga neta más baja.

Además se hacen visibles una serie de péptidos (3 ó 4) cuyo pI está muy próximo a 3,6, ya que no se desplazan de la línea de origen por electroforesis de alto voltaje. Sin embargo, presentan grandes diferencias de movilidad en el disolvente de cromatografía empleado. En total se contabilizan más de 20 péptidos diferentes no precipitados en TCA al 10%.

La evolución en la aparición de péptidos indicada al comparar las figuras 37 y 38, se hace aún más patente en el estado de digestión correspondiente a 20 minutos (figura 39), para la relación de fibrinógeno:tripsina indicada.

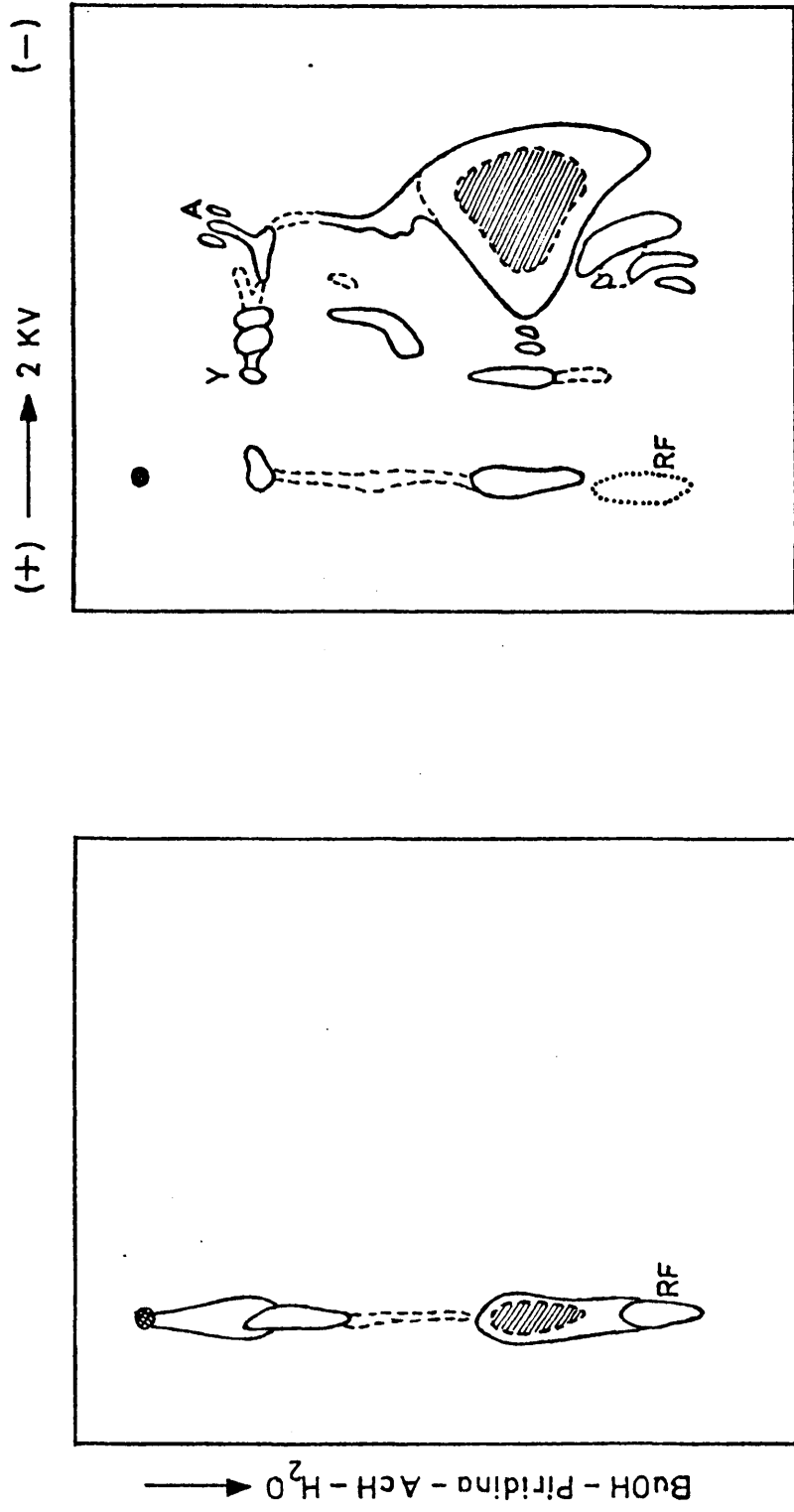
Como se ve en la figura 39, siguen apareciendo los fibrinopéptidos que libera la trombina, pero además hay

FIGURA 38



Mapa peptídico del material soluble después de incubar fibrinógeno con tripsina (1000:1) durante 4 min. y precipitar con TCA 10%. (La región rayada presenta coloración amarilla. R.F.: rojo fenol)

FIGURA 39



Mapa peptídico del material soluble después de incubar fibrinógeno con tripsina (1000:1) durante 20 min. y precipitar con TCA 10%. (La región rayada presenta coloración amarilla. R.F.: rojo fénol).

una serie de fragmentos con igual movilidad cromatográfica y carga positiva intermedia. Sin embargo, ha desaparecido en gran parte la gran mancha que englobaba el péptido A.

También permanecen los péptidos de alta solubilidad en BuOH-Pyr-AcH-H<sub>2</sub>O y elevada carga positiva, presentes desde los momentos iniciales del ataque enzimático y que han ido aumentando en cantidad a lo largo de la proteólisis. Igualmente, permanecen inalterables y ligeramente incrementados los péptidos cuyo pI está próximo a 3,6, aparecidos en la etapa de 4 minutos de digestión enzimática, en que empieza a perder consistencia el coágulo formado por la acción de la tripsina.

IV.- DISCUSSION

El sistema para la coagulación del fibrinógeno (mediante su transformación en fibrina) está íntimamente relacionado con un mecanismo de lisis del coágulo que implica la activación de un enzima proteolítico, la plasmina, y probablemente de proteasas no plásmicas (139), que destruyen la fibrina dando fragmentos solubles algunos de los cuales, de elevada masa molecular, tienen actividad anti-coagulante. En el organismo "in vivo" tienen lugar tanto la fibrinogenolisis como la fibrinolisis, como lo indica la aparición en la sangre de individuos "normales" de fragmentos de masa molecular elevada, correspondientes a los encontrados "in vitro" por incubación del fibrinógeno y fibrina con plasmina o tripsina y otros enzimas proteolíticos (140).

El estudio de la proteolisis controlada del fibrinógeno y fibrina y el conocimiento de los productos de degradación tiene varios aspectos de gran interés para el mejor conocimiento del proceso de coagulación y su regulación. Por un lado, a partir de las magnitudes moleculares y de la cinética de aparición de los fragmentos de masa molecular elevada es posible sacar conclusiones sobre la estructura molecular del fibrinógeno o la fibrina y por otro la-

do, cada vez tiene una mayor importancia desde un punto de vista clínico la detección y estudio de los productos de degradación que aparecen durante la proteólisis.

La presencia de los productos de degradación de masa molecular alta X, Y, D y E aumenta los tiempos de coagulación del fibrinógeno normal, tanto "in vivo" como "in vitro", y puede producir estados patológicos que se deben a una excesiva actividad proteolítica.

Se ha demostrado que esta situación anormal se debe a una polimerización defectuosa de fibrina (141) y a una disminución en la rigidez de los coágulos (142). "In vitro" Latallo (143) observó que los productos de degradación disminuyen considerablemente la velocidad de polimerización del monómero de fibrina y que la estructura de los coágulos estaba muy afectada (144).

Los fragmentos más pequeños no parecen tener un efecto importante (145), en cambio de entre los grandes el llamado fragmento Y es el inhibidor más potente siendo la potencia relativa de los fragmentos X, Y, D y E, 4, 40, 1 y 0,26, respectivamente (146), existiendo una concentración relativa determinada que produce un máximo de inhibición.

Todos estos fragmentos se asocian al coágulo de fibrina aunque no son coagulables por sí solos excepto en el caso del fragmento X obtenido con plasmina en las primeras etapas, que coagula por acción de la trombina a una velocidad

dad pequeña en comparación con el fibrinógeno intacto. En el caso de la fibrina el fragmento X soluble ya no es coagulable. Los fragmentos actúan principalmente como terminadores de la polimerización produciendo polímeros con un corto número de monómeros que pueden permanecer en disolución.

En el presente trabajo se ha prestado una atención especial a las primeras etapas de la degradación del fibrinógeno con tripsina con el fin de estudiar el proceso de solubilización de la fibrina.

Se conoce como la trombina mediante una proteólisis muy específica que implica la liberación de dos pares de péptidos (A y B) de los extremos N-terminales de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$ , pasa la proteína soluble fibrinógeno a otra insoluble, fibrina, que tiene la capacidad de asociarse de un modo ordenado (41), por interacciones principalmente de tipo electrostático (147) en una primera etapa, formando un entramado que constituye la matriz del coágulo en la sangre.

El tipo de enlaces que corta la trombina Arg-Gly deben, en principio, también cortarse por acción de la tripsina y plasmina, que además cortan las cadenas polipeptídicas por residuos de lisina. De estas tres enzimas la tripsina parece ser la única capaz de cortar por todos los residuos Arg o Lys que existan en una cadena proteica, la

plasmina sin embargo es menos activa cortando sólo unos dos tercios de los sitios posibles (148) y la trombina presenta una gran selectividad ya que sólo corta cuatro enlaces en una sólo proteína que es el fibrinógeno a velocidades apreciables (149).

Los numerosos datos existentes en la bibliografía sobre degradación del fibrinógeno con plasmina indican que no se libera, al menos en las etapas iniciales, el péptido A, que es el principal causante de la transformación fibrinógeno-fibrina y por lo tanto no se puede pasar por una etapa de formación de coágulo. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de fragmentos X de masa molecular mayor de 260.000 que son coagulables mediante tratamiento posterior con trombina o liberan péptido A en la misma proporción que el fibrinógeno y cantidades variables de B (72, 81).

Los resultados descritos en el presente trabajo muestran la formación de especies moleculares que coagulan espontáneamente por degradación del fibrinógeno durante las primeras etapas de su incubación con tripsina. En general, se observa una evolución con el tiempo de proteólisis de las propiedades mecánicas del coágulo.

En una primera etapa de la incubación la consistencia y propiedades de retracción así como su respuesta a la compresión mecánica son comparables a las de la fibrina

normal obtenida con trombina. Si la proteólisis ha progresado un poco más el coágulo que se obtiene es menos compacto llegando, a medida que los tiempos de incubación se hacen mayores, a formar un ligero precipitado. Por otra parte, del estudio de las curvas de coagulación producida por la tripsina se deduce que tanto en el caso del fibrinógeno de procedencia humana como bovina, el porcentaje de material insolubilizado crece rápidamente con el tiempo de incubación de la muestra, pasando por un valor máximo para disminuir posteriormente hasta llegar a la desaparición total de cualquier vestigio de coagulación.

En cualquier caso, la fracción de material no coagulado con tripsina contiene cantidades decrecientes de proteína coagulable con trombina al aumentar el tiempo de incubación. Al mismo tiempo un estudio de este material muestra la formación con el tiempo de cantidades crecientes de proteína termoestable que corresponde a fragmentos de masa molecular inferior a 50.000 Dalton , que incluyen los llamados fragmentos E. Se alcanza un valor límite de alrededor de 45% del total de proteína a tiempos grandes.

En los casos estudiados se observa que la proteólisis va acompañada también de la aparición de péptidos solubles en ácido tricloroacético concentrado (10%) que llegan a constituir en el límite un 20-22% del total.

Existen al menos dos efectos en competencia durante

la proteólisis con tripsina, por un lado la formación de fibrina o material que coagula y por otra una degradación que produce material soluble o solubiliza el coágulo formado.

La formación de fibrina por acción poco intensa de la tripsina ha sido observada por varios autores (150, 151, 152, 98) y se explica por la semejanza existente en la especificidad observada sobre sustratos sintéticos con trombina y tripsina, que hacen posible que ésta rompa los cuatro enlaces peptídicos necesarios para pasar el fibrinógeno a fibrina, con la particularidad de que éstos se encuentran precisamente entre los que más fácilmente se cortan (97).

Los estudios electroforéticos de las muestras que corresponden a tiempos de incubación para los que la coagulación es notable (o muy próximos al máximo) muestran en todos los casos que el material coagulado o el que todavía es coagulable al tratar con trombina, aunque permanezca en disolución, está constituido por especies de masa molecular comprendida entre la de trombina intacta y la de los fragmentos X de alrededor de 250.000 Dalton. Tanto los fragmentos X más pequeños como los productos de degradación más avanzados, fragmentos Y, D y E, no son afectados por el tratamiento con trombina (veanse figuras 3, 4 y 11).

La coagulación requiere que la proteólisis no progre

se mucho más allá de la pérdida de los péptidos liberados por la trombina, ya que el material se hace rápidamente soluble o no forma un coágulo consistente. Es evidente que sólo en los primeros momentos del ataque enzimático al fibrinógeno existe formación de coágulo consistente y esto implica (figura 9) la ruptura de un promedio de muy pocos enlaces (máximo alrededor de 4-5) por molécula. Esto concuerda con los resultados de Weinstein y Doolittle (82) y de Mihalyi et al (113), si bien estos últimos autores precisan que sólo se pueden romper promedios de 1 ó 2 enlaces para que no haya pérdida de coagulabilidad en el material.

En el caso concreto de los resultados obtenidos para una relación fibrinógeno humano:tripsina 500:1 se observa que entre los 2 y los 8 minutos de incubación se pasa de tener una coagulación de 25% (con formación de un coágulo consistente) a casi una completa redisolución del material (figura 7). Este proceso implica el paso de una ruptura de un promedio de alrededor de 4 enlaces a los 2 minutos a unos 16 enlaces a los 8 minutos. Sin embargo, los estudios electroforéticos ponen de manifiesto que en ambos casos los fragmentos que permanecen en disolución son solamente del tipo X sin que haya progresado la proteólisis a la formación de fragmentos más pequeños. Esto significa que la pérdida prácticamente total de la capacidad de coagular reside en la pérdida de un 27% de material de la pro

teína inicial de masa molecular 340.000, que en términos de absorción óptica se puede distribuir aproximadamente de la siguiente manera: material inicial no coagulable 5%, péptidos pequeños solubles en TCA (al 10%) que absorben a 280 nm alrededor de 8%, lo que explica aproximadamente el 15% observado de proteína que no coagula por el calor; sobre todo si se tiene en cuenta que la separación de los péptidos A y B, que no absorben en el ultravioleta, suponen del 1 al 2% de la masa inicial de fibrinógeno.

En la proteólisis de fibrinógeno se observa además que una vez sobrepasado el tiempo para el cual tiene lugar el máximo de coagulación, un tratamiento con trombina no produce una coagulación adicional, lo que demuestra que en el material sobrenadante no queda fibrinógeno o fragmentos coagulables. Esto no ocurre en el caso del fibrinógeno en presencia de un inhibidor de la tripsina como el  $\epsilon$ -aminocaproico ( $\epsilon$ -ACA).

Esta diferencia sugiere que la tripsina no inhibida rompe de un modo más selectivo o con mayor rapidez los enlaces Arg-Gly que unen los péptidos A y B en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que el resto de los enlaces que producen la pérdida de la capacidad de coagular.

En la primera etapa de la proteólisis existen: a) moléculas insolubles bien de fibrina prácticamente intacta o fragmentos X de masa molecular elevada que constituyen el

coágulo observado. b) Fragmentos X avanzados no coagulables y péptidos de masa molecular baja (< 20.000 Dalton), y c) material muy poco afectado por la proteólisis (fibrinógeno intacto o X tempranos) que es coagulable al incubar con trombina y que por lo tanto conserva los péptidos A y B. Este último material desaparece al alcanzarse el máximo de coagulación por tripsina.

Por otro lado, estudios inmunológicos con antisue-  
ros específicos del fibrinopéptido A han demostrado que  
fragmentos E obtenidos con plasmina conservan intacto el  
extremo N-terminal de la cadena  $\alpha$  (153). Sin embargo, si  
la proteólisis ha sido muy prolongada se corta también el  
extremo N-terminal de esta cadena precisamente por los en-  
laces Arg-Gly separando el péptido A o también por el  
Arg-Val casi con la misma probabilidad (76). En el caso  
de la proteólisis con tripsina los resultados de Mihalyi  
(154, 155) demuestran que en las primeras etapas del ata-  
que enzimático se liberan péptidos del extremo C-terminal  
de la cadena  $\alpha$  al igual de lo que ocurre con la digestión  
con plasmina. Sin embargo, el proceso de coagulación obser-  
vado con tripsina indica que en este caso se pierde además  
el fibrinopéptido A, necesario para que aparezca la fibri-  
na insoluble.

Del estudio comparativo de la degradación con plas-  
mina y tripsina no se observan diferencias en lo que se re-

fiere a la secuencia y características de movilidad electroforética de los fragmentos de masa molecular elevada (figuras 10, 11 y 13). Sin embargo, los densitogramas muestran que los péptidos de masa molecular inferior al fragmento E que aparecen en los primeros minutos son más estables en el caso de la plasmina (figura 13) si bien tienden a evolucionar hacia especies de tamaño cada vez más pequeño con el tiempo. Resulta evidente que si se tiene en cuenta el número de enlaces cortados por los enzimas para alcanzar un cierto grado de degradación definido por una distribución de fragmentos dada, existen diferencias notables. En el caso de la tripsina se rompen alrededor de 20-24 enlaces antes de que comiencen a observarse fragmentos Y y D (figura 10). Por el contrario, en el caso de la plasmina se observan claramente con solo 16-18 enlaces rotos (figura 13).

Estas diferencias se hacen todavía más exageradas a medida que progresa la degradación. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Mihalyi et al (113) que encuentran una notable diferencia entre los posibles sitios de ataque enzimático en cada caso, 100 para la tripsina y 60 para la plasmina. Esta mayor actividad de la tripsina para alcanzar el mismo grado de degradación explicaría la menor pervivencia de los péptidos separados inicialmente que se degradan mucho más rápidamente que en el

caso de la plasmina.

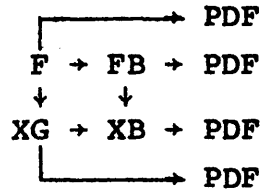
En el caso de la proteólisis del fibrinógeno con plasmina (156) se admite generalmente que la primera fragmentación consiste en la separación de dos péptidos que suponen 40.000 Dalton de los extremos C-terminales de las cadenas  $\alpha$  (157) del fibrinógeno y que no impiden su coagulación, si bien modifican sus características de solubilidad. Por otro lado Mosesson et al (158) han observado que los productos iniciales de la fragmentación de masa molecular elevada son iguales a las distintas subfracciones de fibrinógeno (según su solubilidad) que aparecen "in vivo". Los fragmentos X según Marder et al (70) poseen menos cadenas B $\beta$  intactas y un mayor ataque de las cadenas A $\alpha$ . Recientemente Takagi y Doolittle (76) han demostrado por análisis de las secuencias de aminoácidos en el extremo N-terminal que los fragmentos X pierden con gran facilidad el extremo N-terminal de las cadenas B $\beta$  por ruptura del enlace Arg-Ala.  
42 43

Experimentalmente se ha determinado la variación con el tiempo del porcentaje de material coagulado por acción de la tripsina y del material que coagula después de un tratamiento adicional con trombina. A partir de estos datos se puede obtener por simple diferencia la cantidad de fibrinógeno que no ha sido degradado por la tripsina y la cantidad de material original que está en forma de fragmentos no coagulables (PDF).

El estudio de los materiales presentes por reducción y carboximetilación posterior (Tabla XIV) indica que el material coagulado está constituido por fibrina intacta y fibrina algo degradada incluso a tiempos cortos de incubación. Esta degradación se manifiesta por aparición de fragmentos de cadena  $\alpha$  principalmente. De hecho la capacidad de formar un coágulo consistente sólo se observa cuando la proporción de cadenas  $\alpha$  prácticamente intactas es alrededor de 16-20% que es algo menos de la mitad de las que existen en la fibrina (alrededor de 40%). Sin embargo, se obtiene un precipitado incluso para un porcentaje del orden del 10% que equivale a una cuarta parte.

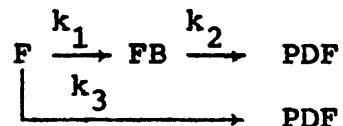
El material no coagulable está constituido por especies moleculares con un contenido en cadenas  $\alpha$  intactas muy pequeño (5-6%) incluso a tiempos pequeños. Por otra parte, este material no coagulable muestra una degradación también de las cadenas  $\beta$ . Todo esto sugiere una degradación semejante a la que se ha observado con la plasmina (76) en las primeras etapas (fragmento X temprano) con la diferencia importante de que la tripsina puede producir una especie que coagula espontáneamente por separación del mismo fibrinopéptido que separa la trombina.

Las posibles etapas del ataque con tripsina al fibrinógeno, a partir de los datos expuestos, pueden esquematizarse de la siguiente forma:



Donde el fibrinógeno intacto F y los fragmentos tempranos XG son material todavía coagulable con trombina. Tanto la fibrina intacta FB como el fragmento temprano que ha perdido al menos el péptido A constituyen el coágulo observable. Por último, los productos de degradación PDF pueden proceder bien directamente del fibrinógeno y de la fibrina o lo que es más probable, de los fragmentos X tanto coagulados como en disolución.

En los estudios cinéticos realizados no se distinguen experimentalmente más que tres etapas de fragmentación molecular, material coagulable que englobará tanto el fibrinógeno como el fragmento XG, otro en forma de coágulo constituido por la fibrina y el fragmento XB y por último los PDF. Así pues, prescindiendo de etapas intermedias se puede representar la degradación con tripsina según el siguiente esquema:



donde  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  son las constantes de velocidad de las distintas reacciones.

La degradación del fibrinógeno (definido en este ca

so como material coagulable) tiene lugar según un proceso exponencial de manera que la concentración en tantos por ciento en cada momento  $F$  viene dada por la ecuación:

$$F = F_0 e^{-kt} \quad \{1\}$$

donde  $F$  es la cantidad de material coagulable a tiempo cero o lo que es lo mismo la coagulabilidad del producto inicial (normalmente  $\approx 95\%$ ) y  $k$  es la constante de velocidad  $k = k_1 + k_3$ , que da cuenta de todos los procesos que degradan el material coagulable. El valor de  $k$  se obtiene mediante una representación semilogarítmica de los valores de  $F$  frente a  $t$ , haciendo un ajuste por mínimos cuadrados y calculando  $k$  del valor de la pendiente de la recta obtenida.

La cantidad de material en forma de coágulo  $FB$  vendrá dada por la diferencia entre el material que pasa a fibrina menos el que se redisuelve porque pasa a PDF, lo que se expresa en la ecuación:

$$d FB(t) = k_1 F(t) dt - k_2 FB(t) dt \quad \{2\}$$

que integrada da

$$FB = \frac{F_0 k_1}{k_2 - k} (e^{-kt} - e^{-k_2 t}) \quad \{3\}$$

La cantidad de material coagulado pasa por un máximo a un tiempo de incubación que viene definido por

$$t_{\max} = \frac{\ln \frac{k}{k_2}}{k - k_2} \quad \{4\}$$

y que se obtiene derivando {3} e igualando a cero.

A partir de los valores observados experimentalmente para  $t_{\max}$  y conocido  $k$  se puede obtener el valor de  $k_2$ . Esto se realiza gráficamente buscando las soluciones al sistema

$$\begin{aligned} y &= k_2 \\ y &= A + \frac{1}{t_m} \ln k_2 \end{aligned} \quad \{5\}$$

donde  $A = k - \frac{1}{t_m} \ln k$  y seleccionando el valor apropiado teniendo en cuenta también el porcentaje máximo de coagulación observado.

Finalmente las cantidades de PDF en cualquier momento vienen dadas por la suma de las que se forman directamente por degradación del material coagulable y las que proceden de la degradación del coágulo, lo que se expone en la ecuación:

$$d \text{ PDF}(t) = k_3 F(t) dt + k_2 F(t) dt \quad \{6\}$$

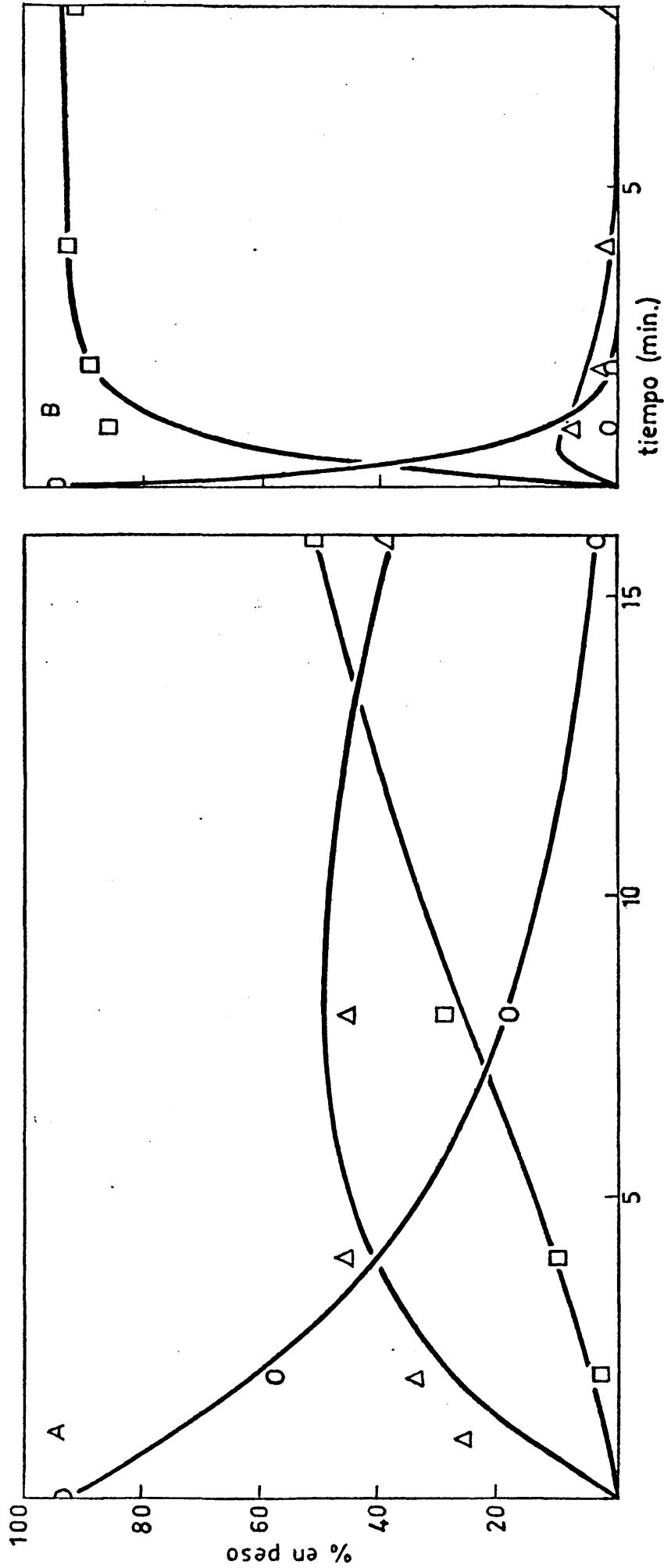
que integrada conduce a

$$\text{PDF} = F_0 \left( 1 + \frac{k_1 k_2}{k_2 - k} \left( \frac{e^{-k_2 t}}{k_2} - \frac{e^{-kt}}{k} \right) - \frac{k_3}{k} e^{-kt} \right) \quad \{7\}$$

donde se conocen todos los parámetros ya que  $k_3 = k - k_1$ .

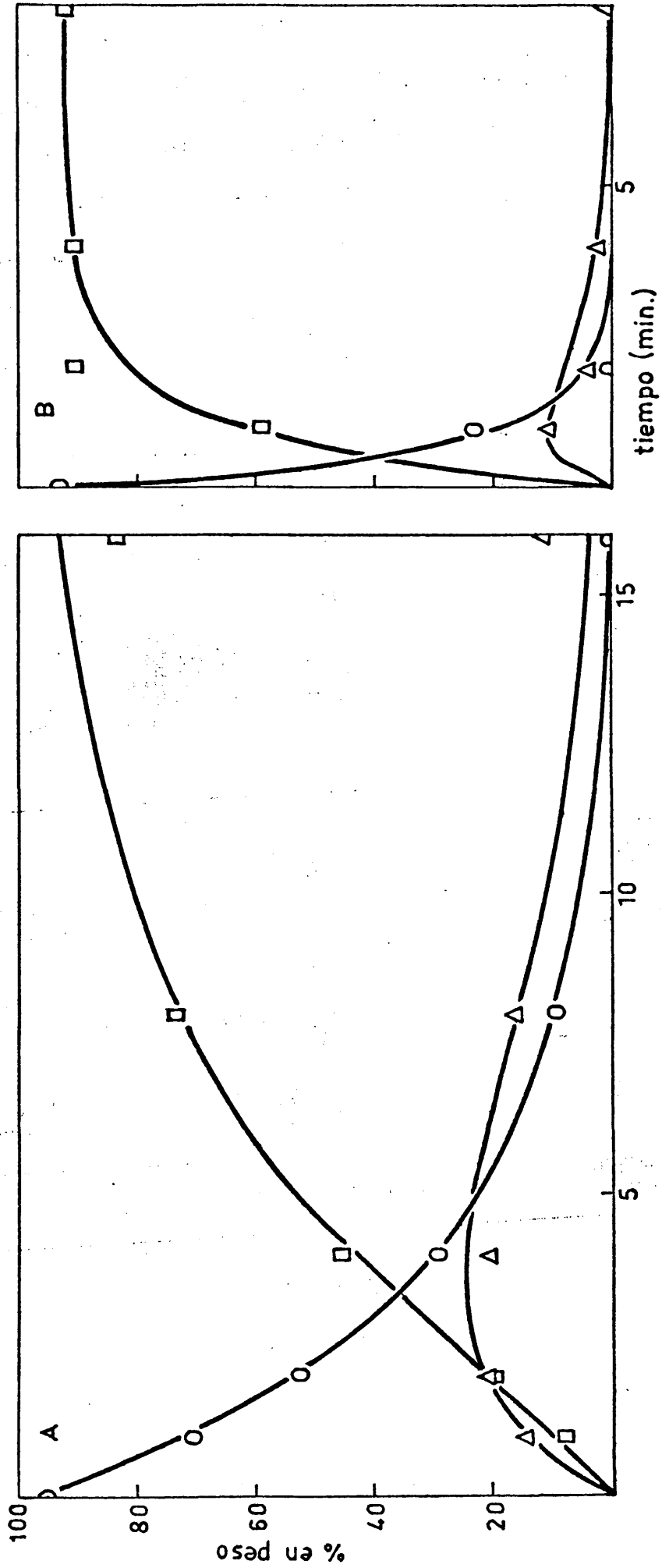
El ajuste que se observa entre las curvas teóricas y los valores experimentales es en general bastante bueno, como se muestra en las figuras 40 y 41 donde se recogen los estudios realizados con fibrinógeno bovino y humano en ausencia y en presencia de  $\epsilon$ -ACA para la misma relación de F:trip

FIGURA 40



A: Proteolisis fibrinogeno bovino:tripsina=250:1, en presencia de  $\epsilon$ -ACA. B: Sin  $\epsilon$ -ACA en el medio.  
O: degradación del material coagulable a lo largo del tiempo.  $\Delta$ : formación y degradación del material coagulado. D: formación de PDF.

FIGURA 41



A: Proteolisis fibrinogeno humano:tripsina=250:1, en presencia de  $\epsilon$ -ACA. B: Sin  $\epsilon$ -ACA en el medio.  
O: degradación del material coagulable a lo largo del tiempo.  $\Delta$ : formación y degradación del material coagulado.  $\square$ : formación de PDF.

sina 250:1.

Los valores de los parámetros obtenidos para los casos estudiados se recogen en la tabla XV. En la última columna se reseñan entre paréntesis los valores máximos de coagulación observados experimentalmente.

Los resultados experimentales observados para bajas concentraciones de enzima (relaciones fibrinógeno:tripsina superiores a 1000:1), que presentan un aspecto distinto en la variación con el tiempo tanto del material coagulado por la tripsina como de la cantidad de material no coagulable en el sobrenadante (figuras 8 y 15) no se ajustan a este mecanismo.

Las razones de esta diferencia de comportamiento pueden estar en que a bajas concentraciones relativas de enzima, el esquema simplificado no se ajuste a la realidad y los pasos de F a XG y FB a XB adquieren una mayor importancia en el proceso general. Por otro lado, el proceso de degradación parece que se hace más eficaz precisamente en el material ya degradado, a medida que disminuye la concentración relativa de enzima, lo cual explica que para relaciones fibrinógeno:tripsina 2000:1 y 4000:1 se obtenga material coagulable por trombina, no afectado, incluso para tiempos en los que el porcentaje de fibrina coagulada comienza a disminuir.

La presencia del aminoácido sintético  $\epsilon$ -ACA introduce

TABLA XV

Relación F:T w:w	k min <sup>-1</sup>	k <sub>1</sub> min <sup>-1</sup>	k <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>	k <sub>3</sub> min <sup>-1</sup>	t <sub>max</sub> (min)	FB <sub>max</sub> %
PARAMETROS DE LA DEGRADACION DE FIBRINOGENO BOVINO						
100:1	2,59	1,54 <sup>o</sup>	2,66	1,06	0,4	20(10)
250:1	2,18	0,44	0,88	1,74	0,7	10(8)
ε-ACA 0,38M en el medio						
40:1	0,31	0,26	1,37	0,05	1,4	12(11)
70:1	0,87	0,86	0,08	0,00 <sub>6</sub>	3	75(72)
250:1	0,20	0,19	0,07	0,01	8	50(46)
=====						
PARAMETROS DE LA DEGRADACION DE FIBRINOGENO HUMANO						
100:1	3,09	0,65	0,62	2,44	0,65	13,5(11)
250:1	1,64	0,38	0,71	1,26	0,9	11,5(11)
500:1	0,67	0,54	0,69	0,13	1,5	27,5(25)
1000:1	0,62	0,40	0,068	0,22	4	48(47)
2000:1	-	-	-	-	8	(14)
4000:1	-	-	-	-	32	(18)
ε-ACA 0,38M en el medio						
250:1	0,3	0,2	0,27	0,1	3,5	25(21)
500:1	0,17	0,16	0,25	0,01	4,8	25,5(25)
1000:1	0,06 <sub>8</sub>	0,04 <sub>3</sub>	0,05 <sub>6</sub>	0,02 <sub>5</sub>	16	24(31)
2000:1	-	-	-	-	60	(32)

ce cambios importantes en la degradación del fibrinógeno con tripsina, inhibiendo el proceso en general y obteniéndose ma yores porcentajes de coagulación.

Este aminoácido se emplea farmacológicamente para frenar o impedir la fibrinolisis (159) debido a una doble función inhibidora, primero en la activación del plasminógeno a concentraciones bajas "in vivo" del orden de  $10^{-4}M$  y en segundo lugar como inhibidor de la plasmina y otras proteasas incluida la tripsina, a concentraciones mayores de  $10^{-1}M$  (136, 160).

En este caso se observa una clara disminución en la constante de velocidad  $k$  al añadir  $\epsilon$ -ACA al medio. Si comparamos los resultados obtenidos para la relación fibrinógeno:tripsina 250:1 aparecen valores de  $k$ , al añadir el inhibidor de 5 a 10 veces más bajos, según se trate de fibrinógeno humano o bovino. Por otra parte, parece algo más rápida la degradación del fibrinógeno bovino que la del humano, aunque tanto el porcentaje máximo de coagulación como el tiempo al que ésta aparece son muy semejantes. Esto conuerda con los resultados obtenidos por Mihalyi et al (113).

En general, los valores de la relación  $k_1/k_3$  para las distintas concentraciones relativas de enzima son claramente mayores en presencia de  $\epsilon$ -ACA; lo que indica que el proceso de degradación del fibrinógeno sin pasar por la etapa fibrina (regido por  $k_3$ ) está inhibido más eficazmente.

Como por otro lado la relación  $k_1/k_2$  no varía mucho ni con la relación fibrinógeno:tripsina ni con la presencia del inhibidor, se explica que en general haya porcentajes de coagulación máximos mucho mayores en presencia de  $\epsilon$ -ACA.

Sin embargo, hay que señalar que a bajas concentraciones de enzimas, concretamente a una relación fibrinógeno humano:tripsina 1000:1, el proceso de coagulación en ausencia de inhibidor puede ser más importante que en presencia de  $\epsilon$ -ACA.

En general, los valores de  $k_1$  en ausencia de inhibidor para relaciones fibrinógeno:tripsina de 250:1, o más altas, son prácticamente constantes y oscilan alrededor de  $0,4-0,5 \text{ min}^{-1}$ , en cambio, en presencia de  $\epsilon$ -ACA puede alcanzar valores muy pequeños, lo que sugiere que la relación rápida de ruptura de enlaces (113) responsable de la coagulación deja en este caso de ser importante, al disminuir la proporción de enzima.

Todo esto indica que a pesar de que la tripsina y plasmina son dos enzimas muy semejantes en cuanto a selectividad, incluso presentar ventajas potenciales la tripsina como enzima fibrinolítica (148) hay una diferencia en el comportamiento frente al fibrinógeno, ya que la tripsina puede producir, a determinadas concentraciones de enzima, una coagulación importante, lo que no se observa con la plasmina. Este hecho podría estar relacionado con la mayor especificidad

dad de la plasmina hacia los residuos lisina (82) contrariamente a lo que ocurre con la tripsina que corta mucho más fácilmente por residuos arginina (161).

La ausencia de coagulación espontánea en el caso de la plasmina proviene sin duda del hecho de que en la se-cuencia de cortes que tienen lugar al comienzo de la degra-dación en el extremo N-terminal de la molécula no se separan ninguno de los fibrinopéptidos A o B. En esta zona que debe de ser crítica, en lo que se refiere a la capacidad de aso-ciarse la fibrina y constituir el coágulo, el primer aconte-cimiento consiste como ya se ha mencionado (76), en la rup-tura del enlace Arg(42)-Ala(43) de la cadena B $\beta$  (162). Por el contrario, los N-terminales de las cadenas A( $\alpha$ ) y  $\gamma$  per-manecen intactos hasta en los fragmentos E tempranos (76).

En el caso de la tripsina el análisis de aminoáci-  
dos NH<sub>2</sub>-terminales del material coagulado a los 3 minutos  
de digestión con una relación fibrinógeno:tripsina 1000:1  
muestran la presencia de Tyr y Gly. La Tyr corresponde al  
N-terminal de la cadena  $\gamma$  y la Gly pone de manifiesto el pa-  
so a fibrina por pérdida del fibrinopéptido A o B (85). La  
aparición también de cantidades apreciables de Ala puede in-  
dicar que la cadena A $\alpha$  está intacta en parte, pero tam-  
bién es compatible con que el material coagulable puede ha-  
ber perdido, como en el caso de la plasmina, el extremo N-  
terminal de la cadena B $\beta$  hasta el residuo Arg(42).

Al avanzar la proteólisis desaparece del material coagulado la Tyr como N-terminal y se encuentra Asp, este hecho sugiere que la cadena  $\gamma$  puede perder un péptido por separación del residuo 5 (Arg-Asp) que no afectaría prácticamente a la movilidad electroforética de la banda correspondiente (4) en tabla XIV. Los otros N-terminales sugieren la existencia de rupturas a otros niveles de la molécula que no implican pérdida de materia y que no afectan a la coagulabilidad de la molécula.

Estos resultados concuerdan con el estudio de los péptidos de baja masa molecular separados en las primeras etapas de la proteólisis con la tripsina, mediante análisis bidimensional por cromatografía y electroforesis de alto voltaje (véase sección III.9). En las mismas condiciones de proteólisis en que se hizo el análisis de amino-terminales en el coágulo se comprueba la presencia de fibrinopéptidos A y B libres, además de otros péptidos de alta solubilidad en el disolvente empleado y carga neta muy positiva. Estos péptidos corresponden al menos en parte por su carácter de alta solubilidad y por su contenido en prolina, al extremo C-terminal de la cadena  $A\alpha$  (157, 93).

Al aumentar el tiempo de proteólisis los péptidos solubles en TCA aumentan en número y cantidad de cada especie apareciendo además especies menos solubles, que sugieren una procedencia de las partes más hidrofóbicas de la molécula.

la, pero no existen grandes variaciones en el conjunto entre 4 y 20 minutos de incubación.

Si se estudia la evolución con el tiempo de incubación de las cadenas peptídicas que constituyen el material que coagula por acción de la tripsina se observa que incluso el material que constituye un coágulo consistente a 3-4 minutos de incubación (50% de proteína inicial) presenta serias modificaciones respecto de las cadenas originales.

Se observa una degradación parcial de las cadenas  $\alpha$  ( $M_w = 75.000-70.000$ ) de manera que en los momentos más avanzados en el coágulo-precipitado (15-20%) sólo existe una cuarta parte aproximadamente de cadenas intactas. También es evidente una banda  $\text{post}\beta$ , de masa molecular estimada de 50.000, claramente distinta de la correspondiente a la  $B\beta$  original ( $M_w = 58.000$ ) y mayor que la cadena  $\gamma$  (47.000), si bien esta banda sólo se aprecia a los 20 minutos e incluso en estas condiciones de mala formación de coágulo sólo aparece como componente minoritario.

El material no coagulable presenta prácticamente una degradación total de las cadenas  $\alpha$  (figura 34) y además incluso a tiempos de incubación cortos aproximadamente la mitad de las cadenas  $\beta$  han desaparecido aumentando proporcionalmente la especie de  $M_w = 50.000$ .

De los restantes fragmentos de cadenas separados por reducción total de la banda siguiente en movilidad a la

(número 5) de  $M_w = 40.000$  cuya proporción no varía con el tiempo de incubación, corresponde muy probablemente a la cadena  $\gamma$  ligeramente degradada y que supone alrededor de un tercio del material de las cadenas  $\gamma$  iniciales.

El resto de las bandas que sufren mayores variaciones con masas moleculares entre 36.000 y 25.000, corresponderían a distintas etapas de fragmentación de los restos de cadenas principalmente.

En definitiva, la pérdida de aproximadamente un 60% de las cadenas  $\alpha$  es el límite de degradación como promedio para que aparezca un coágulo de características normales, manteniéndose casi por completo inalteradas las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  o muy poco degradadas.

#### PROTEOLISIS EN PRESENCIA DE UREA

El trabajo de Ehrlich et al (163) puso de manifiesto que la urea concentrada era capaz de inhibir la formación del coágulo de fibrina o de disolverlo si éste se había obtenido en ausencia de urea.

Los estudios de la fibrina disuelta en urea 3,5M pH 7,5 y fuerza iónica 0,15 por ultracentrifugación analítica y medidas de viscosidad demostraron que las características moleculares de la fibrina correspondían a las del fibrinógeno disuelto en las mismas condiciones. Estos resultados permitieron concluir que el paso del fibrinógeno

a fibrina no implica grandes cambios que repercutan en el comportamiento hidrodinámico de la molécula de fibrina disociada completamente. Sin embargo, al disminuir la concentración de urea a 2,35M se observó la presencia de asociaciones moleculares de la fibrina que en parte se encuentra formando polímeros solubles. Si la urea se eliminaba por completo se obtenía un coágulo idéntico al que se obtiene en ausencia de urea.

Mihalyi (164, 165) estudió con detalle el efecto desnaturalizante de la urea sobre el fibrinógeno demostrando que sólo a concentraciones muy elevadas de urea (8M) se consigue un desovillamiento irreversible de la molécula.

Los estudios realizados en el presente trabajo por proteólisis de fibrinógeno y la fibrina en presencia de urea a 2,35M y 3,5M han permitido observar algunas diferencias en la aparición de especies moleculares de masa molecular elevada por acción de la tripsina o plasmina respecto de las observadas sin urea. Esto indica la existencia en la molécula nativa de aspectos estructurales que sólo se ponen claramente de manifiesto en condiciones ligeramente desnaturalizantes. Por otro lado, la proteólisis en estas condiciones desnaturalizantes, en las etapas iniciales es muy semejante a la observada con fibrinógeno en ausencia de urea, lo que confirma que no hay un desovillamiento general de la molécula que haría asequibles a las proteasas un número mu-

cho mayor de enlaces peptídicos conteniendo arginina o lisina.

Las condiciones experimentales empleadas han permitido realizar un estudio comparativo de la proteólisis de fibrinógeno, monómero de fibrina, fibrina parcialmente polimerizada soluble al aumentar la concentración de urea y fibrina tramada por el factor estabilizador de fibrina (FSF) (166) tanto en disolución, como en forma de coágulo insoluble, incluso en urea 8M.

La fibrina se caracterizó por estudios comparativos con el fibrinógeno por determinación de coeficientes de sedimentación en los disolventes empleados para la proteólisis. Los resultados obtenidos (véase tabla X) demuestran que en condiciones de urea 2,35M una buena fracción de la fibrina (>60%) está en forma de oligómeros de fibrina dependiendo esta fracción del pH y de la concentración salina del medio. En presencia de concentraciones bajas de calcio ( $2,5 \times 10^{-3} \text{M}$ ), necesario para la estabilización de la fibrina por formación de enlaces covalentes entre las cadenas  $\gamma$  (125), se observan valores del orden del 30% para el oligómero más pesado, en cambio a una concentración de  $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$  prácticamente sólo existe la especie intermedia y en pequeñas proporciones. Sin embargo, se demuestra que en presencia de calcio y cisteína se pueden estabilizar las asociaciones de fibrina por acción del FSF presente en la muestra,

ya que contrariamente a lo que ocurre con la fibrina no tra  
mada al aumentar la concentración de urea a 3,5M permanece  
asociada un 16% de la fibrina original.

Una estimación de las masas moleculares de los oli-  
gómeros basada en la conocida proporción entre masas molecu-  
lares y coeficientes de sedimentación para proteínas desovi-  
lladas  $\frac{M_1}{M_2} = \left(\frac{s_1}{s_2}\right)^{3/2}$  permite establecer que las espe-  
cies asociadas son dímeros las menos abundantes (4-8%) y trí-  
meros o posiblemente tetrámeros la más pesada.

La variación del consumo de equivalentes de base  
(NaOH) con el tiempo de proteólisis con tripsina muestra que  
la presencia de urea hace menos rápida la etapa inicial en  
la que se cortan un número limitado de enlaces (113) e inclu-  
so que esta inhibición es más notable al aumentar la concen-  
tración de urea. Sin embargo, el número total de enlaces ro-  
tos en el periodo de tiempo estudiado no cambia de un modo  
significativo en función del tipo de sustrato. En el caso  
de la plasmina el efecto de la urea es mucho más notable y  
se han tenido que emplear concentraciones relativas de en-  
zima 5 veces mayores para obtener una velocidad de reacción  
comparable, aunque todavía inferior a la observada sin urea.

En general se observa que la parte inicial de mayor  
pendiente, reacción más rápida, incluye un número mucho ma-  
yor de enlaces en el caso de la tripsina que de la plasmina,  
de acuerdo con los resultados de Mihalyi et al (113) que es

tima en 21 y 3, respectivamente.

La proteólisis del fibrinógeno en urea 3,5M produce especies que coagulan sin necesidad de trombina, llegándose en las condiciones estudiadas a obtener hasta un 30% del material inicial coagulado cuando una vez detenida la reacción se elimina la urea por diálisis.

Este comportamiento es comparable al menos cualitativamente al observado en ausencia de agente desnaturizante, lo que sugiere que no hay cambios conformacionales que afecten al núcleo N-terminal del fibrinógeno por acción de la urea capaces de alterar la secuencia del ataque inicial de la tripsina de manera que se produzca solamente material no coagulable.

Contrariamente a lo observado sin urea incluso en las etapas iniciales, con un promedio de enlaces rotos bajo (tres a los dos minutos) ya aparecen fragmentos Y, aunque todavía queda más de un 30% del material que coagula al incubarse con trombina. Esto sugiere que la degradación en estas condiciones es más rápida relativamente sobre el material ya atacado por el enzima que en ausencia de urea.

El estudio de los fragmentos de masa molecular elevada por EGPA muestra la presencia de especies moleculares que no aparecen en ausencia de urea, además de las ya estudiadas X, Y, D y E.

La variación con el tiempo de incubación del número

de moléculas por cien de fibrinógeno inicial permite observar que además de los fragmentos X ( $M_w = 280.000-220.000$ ) existen dos fragmentos intermedios Y (170.000) y A (130.000) con una cinética paralela (figura 19) pasando por un valor máximo y desapareciendo al aumentar las cantidades de los fragmentos más pequeños. Entre los fragmentos D (95.000) y E (46.000) aparecen dos nuevos fragmentos,  $B_2$  (75.000) y  $B_1$  (65.000) y un pico de movilidad superior al E, C (32.000) que no se observan en la proteólisis en ausencia de urea.

La cinética de aparición de todos estos fragmentos indica un mecanismo más complejo que el descrito por Albert et al (98) y Mihalyi (97) para el fibrinógeno en disolvente salino.

Los resultados obtenidos en urea se explican si se admite que los fragmentos A son como Y degradados precisamente en la parte correspondiente a la zona C-terminal, ya que los fragmentos E que se obtienen son los que corresponden al fibrinógeno original, esto es 100 para tiempo infinito. Los fragmentos B que aparecen casi simultáneamente con los D se deben a una degradación instantánea de los fragmentos D incluso en la etapa en que están unidos al E para constituir el Y o el A. Esta degradación de los fragmentos D lo han observado otros autores con plasmina y tripsina en ausencia y presencia de urea (68, 75, 167, 168). Sin embargo, se trataba de una degradación por ataque posterior y de

una manera gradual. En este caso, por el contrario, todo parece indicar que estamos ante una característica estructural de los fragmentos D que se pone de manifiesto en presencia de urea. Así pues, el fibrinógeno está constituido por las zonas de las cadenas  $\alpha$  degradables en péptidos de masa molecular baja, el núcleo N-terminal de las seis cadenas de la molécula que forman el fragmento E y que no es afectado por la urea y las dos partes restantes que forman los fragmentos D y que según estos resultados están constituidos por al menos dos subunidades que darían lugar a los fragmentos B y C además del D.

En el caso de la fibrina disuelta en urea 3,5M aparecen las mismas especies moleculares que con el fibrinógeno, sin embargo la cinética de aparición de los fragmentos es algo distinta en el sentido de que aparece una mayor proporción de los fragmentos A y los fragmentos B crecen más rápidamente que los D. Por otro lado, los fragmentos C claramente se desdoblán en  $C_1$  (36.000) y  $C_2$  (30.000).

Al disminuir la concentración de urea a 2,35M los fragmentos A, B y C son casi inapreciables, transcurriendo el proceso de degradación como en el caso del fibrinógeno en ausencia de urea. Esto confirma que es sólo la acción de la urea 3,5M la que pone de manifiesto una o dos zonas de la molécula susceptibles de ser cortadas por la tripsina y que este fenómeno es algo más eficaz en el caso de la fibrini

na que del fibrinógeno.

En lo que se refiere al efecto de la proteolisis sobre la formación de coágulo al dializar la urea, se observa que se obtiene un coágulo consistente sólo cuando el material degradado o soluble no sobrepasa el 30% del inicial, lo que coincide con los tiempos de máxima aparición de X , sin que apenas comiencen a aparecer los Y (tabla VIII).

Por otro lado, la formación de productos de degradación no coagulables es más rápida en urea 3,5M que en 2,35M confirmando la idea de que la urea expone simultáneamente a la acción de la proteasa más enlaces peptídicos que contienen lisina o arginina.

La plasmina en presencia de urea 3,5M degrada la fibrina de modo parecido a la tripsina en lo que se refiere a formación de fragmentos, si bien hay algunas diferencias . Aparecen en menor cantidad los fragmentos A y B que con tripsina pero se distingue claramente dos tipos de fragmentos D con masas moleculares de 100.000 y 85.000 y además de los fragmentos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> aparecen en cantidades considerables bandas de movilidad elevada que evolucionan con el tiempo y que comprenden especies entre 22.000 y 9.500, que no se observan con la tripsina, probablemente debido a que con esta proteasa se degradan más rápidamente. Basta comparar el número de equivalentes de base consumidos por la plasmina en estas circunstancias, alrededor de 24 enlaces, con los que

ha consumido la tripsina alrededor de 60-70, para tener el mismo tipo de fragmentos de masa molecular alta.

Estudios con fibrina tramada y comparando los resultados obtenidos incubando con tripsina y plasmina bien el coágulo de fibrina insoluble en urea o polímeros de fibrina tramada solubles en urea 3,5M, se observa:

1°) Con la fibrina insoluble en urea 8M tanto con tripsina como con plasmina aparecen en los primeros momentos sólo péptidos de masa molecular baja (11.000) que probablemente no afectan al entramado de fibrina.

2°) Al progresar la proteólisis aparecen simultáneamente fragmentos de masa molecular muy variada pudiéndose identificar los que corresponden por su tamaño a los Y, A (aunque en muy poca proporción), D más o menos degradados (tablas XII y XIII) y a los E. Sin embargo, hay que señalar que solamente los E parecen no sufrir ni degradaciones ni estar asociados por la proporción mayoritaria en que se encuentran.

3°) Aparecen también fragmentos de masa molecular más elevada entre 300.000-230.000 que son a su vez degradables. Sin embargo, hay otros fragmentos que se han denominado G que aparecen como predominantes en las últimas etapas de la proteólisis, cuando todo el material se ha disuelto, con masa molecular  $M_w = 180.000$ , que es el doble de los fragmentos D.

Esto indica que la estabilización de la fibrina tiene lugar preferentemente uniendo las partes de la molécula alejadas del nudo N-terminal que no se ve afectado. Dicho en otros términos, las uniones covalentes formadas por transaminación entre grupos glutamina y lisina de las cadenas  $\gamma$  y las que se forman entre las cadenas  $\alpha$  (125, 169) están en la zona de la molécula que corresponde a los fragmentos D.

En el caso de la fibrina soluble en urea concentrada parcialmente tramada se tienen dos tipos de especies moleculares de partida, monómeros y oligómeros tramados. Pero ha sido posible hacer un estudio cinético de la aparición de las distintas especies. En este aspecto hay que señalar que una vez desaparecen los fragmentos X resultantes de la fibrina no tramada, comienza a aparecer un fragmento de masa molecular 238.000 llamado H que va creciendo y otro en cantidades comparables del G de masa molecular de 200.000.

Es evidente que si los oligómeros de fibrina están estabilizados por uniones covalentes en principio cabeza-cola, una fragmentación enzimática de estos polímeros daría en las etapas finales fragmentos D-D de masa molecular 200.000-180.000 y fragmentos D-Y que tendrían una masa molecular entre 260.000 y 230.000, según el grado de degradación del conjunto D.

Los resultados experimentales obtenidos incluso con fibrina tramada insoluble en la que deben existir asociacio

nes laterales además de las de cabeza-cola, muestran en una etapa final fragmentos H y G y no polímeros de masa molecular mayor de 240.000. Esto sugiere que las uniones covalentes incluso cuando intervienen las cadenas  $\alpha$  sólo implican a dos fragmentos D contiguos.

Esto está de acuerdo con los resultados de Feddersen y Gormsen (170) y en contra de la sugerencia de otros autores (84) a menos que al ser la cadena  $\alpha$  una de las más fácilmente degradables las uniones  $\alpha$ - $\alpha$  sean separadas del resto de la molécula por la proteólisis en las primeras etapas.

V.- CONCLUSIONES

1°. Se demuestra que durante las primeras etapas de la proteólisis con tripsina se forman especies que coagulan espontáneamente. En general, se observa una evolución, con el tiempo de proteólisis, de las propiedades mecánicas del coágulo.

En una primera etapa de incubación en la que sólo aparecen especies de masa molecular igual a la de la fibrina o fragmentos X pesados, la consistencia así como su respuesta a la compresión mecánica son comparables a las de la fibrina normal obtenida con trombina. Si la proteólisis progresa un poco más el coágulo que se obtiene es menos compacto, llegando a ser un precipitado ligero.

2°. Existen al menos dos procesos en competencia durante la proteólisis de fibrinógeno bovino y humano con tripsina. Por un lado ocurre la formación de fibrina o material que coagula y por otro tiene lugar una degradación que produce material soluble o que solubiliza el coágulo formado. Por el contrario con plasmina no existe proceso de coagulación y si una degradación muy semejante.

La formación de coágulo consistente a partir de fi-

brinógeno por acción de la tripsina, implica la ruptura de un promedio de muy pocos enlaces (máximo alrededor de 4-5) por molécula, como ocurre con la trombina.

La pérdida prácticamente total de la capacidad de coagular reside en la pérdida de un 27% de material de la proteína inicial de masa molecular 340.000.

- 3°. El límite de degradación como promedio para que aparezca un coágulo de características normales es la ruptura de aproximadamente un 60% de las cadenas  $\alpha$ , manteniéndose casi por completo inalteradas las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  o muy poco degradadas. La degradación de las cadenas  $\beta$  impide la coagulación aunque no haya gran variación en la masa molecular del fragmento resultante.
- 4°. Los estudios realizados de degradación con tripsina se ajustan a un esquema simplificado con 3 etapas de fragmentación molecular, de forma que el material coagulable (tanto fibrinógeno como el fragmento XG) da lugar a material que coagula espontáneamente (FB o XB) o a PDF, según reacciones definidas con constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_3$  respectivamente y, a su vez, el material que coagula espontáneamente es degradado a PDF, según una constante de velocidad  $k_2$ .
- 5°. Para concentraciones bajas de tripsina, los resultados no concuerdan con el anterior mecanismo de degradación simplificado ya que posiblemente los pasos de F a XG

y de FB a XB adquieren una mayor importancia en el pro  
ceso.

- 6°. El ácido  $\epsilon$ -aminocaproico es un inhibidor de la fibrinol  
lisis ya que la constante de velocidad  $k$  que da cuenta  
de los procesos de degradación del material coagulable,  
disminuye de 5 a 10 veces según se trate de fibrinóge-  
no humano o bovino. Sin embargo, los valores de la re-  
lación  $k_1/k_3$  para las distintas concentraciones relatiu  
uvas de enzima son claramente mayores, indicando que el  
proceso regido por  $k_3$  está inhibido más eficazmente.

Por el contrario, la relación  $k_1/k_2$  no varía mucho  
ni con la relación fibrinógeno:tripsina, ni por la pre  
presencia del inhibidor.

Todo ello explica que en general al incubar con  
tripsina haya porcentajes de coagulación máximos bas-  
tante mayores en presencia de  $\epsilon$ -ACA que en ausencia  
ausencia del inhibidor.

- 7°. Los estudios realizados permiten concluir que estructuu  
uralmente el fibrinógeno está constituido por: a) las  
zonas de las cadenas  $\alpha$  fácilmente degradables en péptiu  
udos de masa molecular baja; b) el núcleo N-terminal de  
las seis cadenas de la molécula que forman el fragmen-  
to E y que no es afectado por la urea, y c) dos frag-  
mentos D (100.000-95.000) que según los resultados ob-  
tenidos en urea concentrada están constituidos por dos

subunidades (B (75.000-65.000) y C (36.000-30.000) que darían lugar en condiciones no desnaturalizantes, a los fragmentos D tardíos.

8°. Tanto en las etapas finales de fragmentación enzimática de los oligómeros de fibrina estabilizados por uniones covalentes como de la fibrina tramada insoluble, se observa sólo la existencia de fragmentos de masa molecular inferior a 240.000 y finalmente fragmentos D-D (200.000-180.000). Esto sugiere que las uniones covalentes entre monómeros de fibrina incluso cuando intervienen las cadenas  $\alpha$  (fibrina estabilizada insoluble en urea 8M) unen a dos moléculas contiguas y precisamente por los fragmentos D de la molécula, a menos que al ser la cadena  $\alpha$  la más fácilmente degradable, las uniones  $\alpha$ - $\alpha$  sean separadas del resto de la fibrina por la proteólisis en las primeras etapas.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- (1) SHULMAN, S.  
J. Am. Chem. Soc. 75, 5846 (1953)
- (2) CASPARY, E.A. y KEKWICK, R.A.  
J. Biochem. 67, 41 (1957)
- (3) KATZ, S., GUTFREUND, K., SHULMAN, S. y FERRY, J.D.  
J. Am. Chem. Soc. 74, 5706 (1952)
- (4) CARTWRIGHT, T. y KEKWICK, R.G.O.  
Biochim. Biophys. Acta 236, 550 (1971)
- (5) HENSCHEN, A. y BLOMBÄCK, B.  
Ark. Kemi 22, 347 (1964)
- (6) MIHALYI, E., SMALL, P.A.Jr. y COOKE, J.P.  
Arch. Biochem. Biophys. 106, 229 (1964)
- (7) BETTELHEIM, F.R.  
J. Am. Chem. Soc. 76, 2838 (1954)
- (8) BLOMBÄCK B. y BLOMBÄCK, M.  
"Chemotaxonomy and Serotaxonomy" (J.G. Hawkes, ed.)  
Academic Press, London (1968) p. 3.
- (9) WOODING, G.L. y DOOLITTLE, R.F.  
J. Hum. Evol. 1, 553 (1972)
- (10) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., DOOLITTLE, R.F.,  
HESSEL, B. y EDMAN, P.  
Biochim. Biophys. Acta 78, 563 (1963)
- (11) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., EDMAN, P. y HESSEL, B.  
Nature 193, 883 (1962)
- (12) OSBAHR, A.J.Jr., COLMAN, R.W., LAKI, K. y GLADNER, J.A.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 555 (1964)

- (13) KRAJEWSKI, T. y CIERNIEWSKI, C.  
Biochim. Biophys. Acta 271, 174 (1972)
- (14) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M. y SEARLE, J.  
Biochim. Biophys. Acta 74, 148 (1963)
- (15) WITT, I. y MÜLLER, H.  
Biochim. Biophys. Acta 221, 402 (1970)
- (16) BLOMBÄCK, B.  
Ark. Kemi 12, 99 (1958)
- (17) RAISLYS, V., MOLNAR, J. y WINZLEZ, R.J.  
Arch. Biochem. Biophys. 113, 457 (1966)
- (18) MOSESSON, M.W., ALKJAERSIG, N., SWEET, B. y  
SHERRY, S.  
Biochemistry 6, 3279 (1967)
- (19) GAFFNEY, P.J.  
Biochim. Biophys. Acta 263, 453 (1972)
- (20) HENSCHEN, A. y EDMAN, P.  
Biochim. Biophys. Acta 263, 351 (1972)
- (21) MILLS, D.A. y TRIANTAPHYLLOPOULOS, D.C.  
Arch. Biochem. Biophys. 135, 28 (1969)
- (22) MESTER, L., MOCZAR, E., VASS, G. y SZABADOS, L.  
Pathol. Biol. 13, 540 (1965)
- (23) BLOMBÄCK, B. y YAMASHINA, J.A.  
Ark. Kemi 12, 299 (1958)
- (24) Mc KEE, P.A., ROGERS, L.A., MARLER, E. y HILL, R.L.  
Arch. Biochem. Biophys. 116, 271 (1966)
- (25) MILLS, D. y KARPATKIN, S.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 206 (1970)
- (26) PIZZO, S.V., SCHWARTZ, M.L., HILL, R.L. y McKEE, P.A.  
J. Biol. Chem. 247, 636 (1972)

- (27) DAYHOFF, M.O.  
"Atlas of Protein Sequence and Structure". Nat. Bio  
med. Res. Found., Silver Spring, Maryland.
- (28) BLOMBÄCK, B. y DOOLITTLE, R.F.  
Acta Chem. Scand. 17, 1816 (1963)
- (29) BLOMBÄCK, B. y DOOLITTLE, R.F.  
Acta Chem. Scand. 17, 1819 (1963)
- (30) MROSS, G.A. y DOOLITTLE, R.F.  
Arch. Biochem. Biophys. 122, 674 (1967)
- (31) BLOMBÄCK, B. y VESTERMARK, A.  
Ark. Kemi 12, 173 (1958)
- (32) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., EDMAN, P. y HESSEL, B.  
Biochim. Biophys. Acta 115, 371 (1966)
- (33) BAILEY, K., BETTELHEIM, R.F., LORAND, L. y  
MIDDLEBROOK, W.R.  
Nature 167, 233 (1951)
- (34) BETTELHEIM, R.F. y BAILEY, K.  
Biochim. Biophys. Acta 9, 578 (1952)
- (35) BETTELHEIM, R.F.  
Biochim. Biophys. Acta 19, 121 (1956)
- (36) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M. y NILSSON, I.M.  
Thromb. Diath. Haemorrh. 1, 76 (1957)
- (37) MIHALYI, E.  
Acta Chem. Scand. 4, 351 (1950)
- (38) HASCHEMEYER, A.E.V.  
Biochemistry 2, 851 (1963)
- (39) DOOLITTLE, R.F.  
Adv. Protein Chem. 27, 1 (1973)

- (40) SHULMAN, S., HERWIG, W.C. y FERRY, J.D.  
Arch. Biochem. Biophys. 32, 354 (1951)
- (41) FERRY, J.D.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 38, 566 (1952)
- (42) FERRY, J.D. y MORRISON, P.R.  
J. Am. Chem. Soc. 69, 388 (1947)
- (43) ROBBINS, K.C.  
Amer. J. Physiol. 142, 581 (1944)
- (44) LAKI, K. y LORAND, L.  
Science 108, 280 (1948)
- (45) CHEN, R. y DOOLITTLE, R.F.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 472 (1970)
- (46) KAY, D. y CUDDIGAN, B.J.  
Brit. J. Haematol. 13, 341 (1967)
- (47) CHEN, R. y DOOLITTLE, R.F.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 420 (1969)
- (48) HALL, C.E. y SLAYTER, H.S.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 11 (1959)
- (49) JOHNSON, P. y MIHALYI, E.  
Biochim. Biophys. Acta 102, 467 (1965)
- (50) KÖPPEL, G.  
Z. Zellforsch. 77, 443 (1967)
- (51) LEDERER, A. y FINKELSTEIN, K.  
Biopolymer 9, 1553 (1970)
- (52) POUIT, L., MARDER, V.J., SUSCILLON, M., BUDZYNSKI, A.Z. y HUDRY-CLERGEON, G.  
Biochim. Biophys. Acta 400, 189 (1975)
- (53) POUIT, L., MARCILLE, G., SUSCILLON, M. y HOLLARD, D.  
Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 559 (1972)

- (54) MARGUERIE, G., POUIT, L. y SUSCILLON, M.  
Thromb. Res. 3, 675 (1973)
- (55) POUIT, L., HUDRY-CLERGEON, G. y SUSCILLON, M.  
Biochim. Biophys. Acta 317, 99 (1973)
- (56) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., HESSEL, B. e IWANAGA, S.  
Nature 215, 1445 (1967)
- (57) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., HENSCHEN, A.,  
HESSEL, B., IWANAGA, S. y WOODS, K.R.  
Nature 218, 130 (1968)
- (58) BLOMBÄCK, B.  
J. Haematol. 17, 145 (1969)
- (59) HENSCHEN, A.  
Acta Chem. Scand. 16, 1037 (1962)
- (60) HESSEL, B.  
Tesis Doctoral, Stockholm 1975.
- (61) WOODS, K.R., HOROWITZ, M.S. y BLOMBÄCK, B.  
Thromb. Res. 1, 113 (1972)
- (62) BLOMBÄCK, B., HESSEL, B., IWANAGA, S., REUTERBY, J.  
y BLOMBÄCK, M.  
J. Biol. Chem. 247, 1496 (1972)
- (63) BLOMBÄCK, B., GRÖNDAHL, N.J., HESSEL, B.,  
IWANAGA, S. y WALLEN, P.  
J. Biol. Chem. 248, 5806 (1973)
- (64) MILLS, D.A. y LIENER, I.E.  
Arch. Biochem. Biophys. 130, 629 (1969)
- (65) MOSESSON, M.W. y FINLAYSON, J.S.  
"Progress in Hemostasis and Thrombosis" Vol. 3.  
(Spaet, T.H., Grune & Stratton, ed.) New York.  
(1976) p. 61.

- (66) GÄRDLUND, B., KOWALSKA-LOTH, B., GRÖNDAHL, N.J.  
y BLOMBÄCK, B.  
Thromb. Res. 1, 371 (1972)
- (67) BLOMBÄCK, B., BLOMBÄCK, M., FINKBEINER, W.,  
HALMGREEN, A., KOWALSKA-LOTH, B. y OLAVSON, G.  
Thromb. Res. 4, 55 (1974)
- (68) FURLAN, M. y BECK, E.A.  
Biochim. Biophys. Acta 263, 631 (1972)
- (69) NUSSENZWEIG, V., SELIGMANN, M., PELMONT, J.  
y GRABAR, P.  
Ann. Inst. Pasteur 100, 377 (1961)
- (70) MARDER, V.J., SHULMAN, N.R. y CARROLL, W.R.  
J. Biol. Chem. 244, 2111 (1969)
- (71) MARDER, V.J., BUDZYNSKI, A.Z. y JAMES, H.L.  
J. Biol. Chem. 247, 4775 (1972)
- (72) BUDZYNSKI, A.Z., MARDER, V.J. y SHAINOFF, J.R.  
J. Biol. Chem. 249, 2294 (1974)
- (73) DUDEK, G.A., KLOCZEWIAK, M., BUDZYNSKI, A.Z.,  
LATALLO, Z.S. y ZOPEC, M.  
Biochim. Biophys. Acta 214, 44 (1970)
- (74) HEENE, D.L. y MATTHIAS, F.R.  
Thromb. Res. 2, 137 (1973)
- (75) FURLAN, M., KEMP, G. y BECK, E.A.  
Biochim. Biophys. Acta 400, 95 (1975)
- (76) TAKAGI, T. y DOOLITTLE, R.F.  
Biochemistry 14, 940 (1975)
- (77) PIZZO, S.V., SCHWARTZ, M.L., HILL, R.L. y MCKEE, P.A.  
J. Biol. Chem. 248, 4574 (1973)

- (78) KOWALSKA-LOTH, B., GÄRDLUND, B., EGBERG, N.  
y BLOMBÄCK, B.  
Thromb. Res. 2, 423 (1973)
- (79) NUSSENZWEIG, V., SELIGMANN, M. y GRABAR, P.  
Ann. Inst. Pasteur 100, 490 (1961)
- (80) MOSESSON, M.W., FINLAYSON, J.S. y GALANAKIS, D.K.  
J. Biol. Chem. 248, 7913 (1973)
- (81) MARDER, V.J. y BUDZYNSKI, A.Z.  
Thromb. Diath. Haemorrh. 33, 199 (1975)
- (82) WEINSTEIN, M.J. y DOOLITTLE, R.F.  
Biochim. Biophys. Acta 258, 577 (1972)
- (83) ARNESEN, H.  
Scand. J. Haematol. Suppl. 13, 43 (1971)
- (84) HUDRY-CLERGEON, G., MARGUERIE, G., POUIT, L.  
y SUSCILLON, M.  
Thromb. Res. 6, 533 (1975)
- (85) BLOMBÄCK, B. y BLOMBÄCK, M.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 77 (1972)
- (86) MATTOCK, P. y ESNOUF, M.P.  
Nature New Biol. 233, 277 (1971)
- (87) CHEN, R. y DOOLITTLE, R.F.  
Biochemistry 10, 4486 (1971)
- (88) DOOLITTLE, R.F., CASSMAN, K.G., CHEN, R., SHARP, J.J.  
y WOODING, G.L.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 114 (1972)
- (89) GORMSEN, J., FEDDERSEN, C., CLEMMENSEN, I.  
y ANDERSEN, R.B.  
Scand. J. Haematol. 9, 577 (1972)

- (90) COLLEN, D., KUDRYK, B., HESSEL, B. y BLOMBÄCK, B.  
J. Biol. Chem. 250, 5808 (1975)
- (91) MIHALYI, E. y GODFREY, J.E.  
Biochim. Biophys. Acta 132, 94 (1967)
- (92) MIHALYI, E. y GODFREY, J.E.  
Biochim. Biophys. Acta 67, 73 (1963)
- (93) SHRAGER, R.I., MIHALYI, E. y TOWNE, D.W.  
Biochemistry 15, 5382 (1977)
- (94) WEINBERG, R.M. y MIHALYI, E.  
Fed. Proc. 30, 1076 (1971)
- (95) FLETCHER, A.P., ALKAERSIG, N., FISHER, S.  
y SHERRY, S.  
J. Lab. Clin. Med. 68, 780 (1966)
- (96) MILLS, D. y KARPATKIN, S.  
Fed. Proc. 30, 1076 (1971)
- (97) MIHALYI, E.  
"Application of Proteolytic Enzymes to Protein  
Structure Studies". CRC Press (1972)
- (98) ALBERT, A., REGAÑON, E., SAIZ, J.L. y USOBIAGA, P.  
Biochim. Biophys. Acta 386, 382 (1975)
- (99) CELANDER, D.R. y GUEST, M.M.  
Arch. Biochem. Biophys. 72, 176 (1957)
- (100) GORMSEN, J., FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N.  
y SHERRY, S.  
Arch. Biochem. Biophys. 120, 654 (1967)
- (101) LAKI, K.  
Arch. Biochem. Biophys. 32, 317 (1951)
- (102) MAYO, E.B. y ROTHSTEIN, F.  
Science 155, 1018 (1967)

- (103) MIHALYI, E.  
Biochemistry 7, 208 (1968)
- (104) BLOMBÄCK, B.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 364 (1968)
- (105) SHULMAN, S., ERLICH, P. y FERRY, J.D.  
J. Am. Chem. Soc. 73, 1388 (1951)
- (106) WARREN, J.R. y GORDON, J.A.  
J. Phys. Chem. 70, 297 (1966)
- (107) STARK, G.R., STEIN, W.H. y MOORE, S.  
J. Biol. Chem. 235, 3177 (1960)
- (108) WERNER, E.A.  
J. Chem. Soc. 123, 2577 (1923)
- (109) SCHWERT, G.W. y TAKENAGA, Y.  
Biochim. Biophys. Acta 16, 570 (1955)
- (110) MIHALYI, E.  
Comunicación personal
- (111) ROBBINS, C. y SUMMARIA, L.  
En "Methods in Enzymology", Vol. XIX. (McCormick, G.B. y Wright, L.D., ed.) Academic Press, New York, (1967) p. 184.
- (112) ROBBINS, C., SUMMARIA, L., ELWYN, D. y BARLOW, G.H.  
J. Biol. Chem. 240, 541 (1965)
- (113) MIHALYI, E., WEINBERG, R.M., TOWNE, D.W. y FRIEDMAN, M.E.  
Biochemistry 15, 5372 (1976)
- (114) GORDON, A.H.  
"Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels". (Work, T.S. y Work, E., ed.), North Holland Publishing Company/American Elsevier, (1975) p. 13.

- (115) RODBARD, D., KAPADIA, G. y CHRAMBACH, A.  
Anal. Biochem. 40, 135 (1971)
- (116) PITT-RIVERS, R. e IMPIOMBATO, F.S.  
Biochem. J. 109, 825 (1968)
- (117) CHRAMBACH, A. y RODBARD, D.  
Science 172, 440 (1971)
- (118) RODBARD, D., REYNOLDS, J.A. y TANFORD, C.  
J. Biol. Chem. 245, 5161 (1970)
- (119) BANKER, G.A. y COTMAN, C.W.  
J. Biol. Chem. 247, 5856 (1972)
- (120) SWANK, R.T. y MUNKRES, K.D.  
Anal. Biochem. 39, 462 (1971)
- (121) ORNSTEIN, L.  
N.Y. Acad. Annals 121, 321 (1964)
- (122) DAVIS, B.J.  
N.Y. Acad. Annals 121, 404 (1964)
- (123) WEBER, K. y OSBORN, N.  
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
- (124) DAHLBERG, A.E., DINQUIAN, C.W. y PEACOCK, A.C.  
J. Mol. Biol. 41, 139 (1969)
- (125) MCKEE, P.A., MATTOCK, P. y HILL, R.L.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 738 (1970)
- (126) BRUMMEL, M.C. y MONTGOMERY, R.  
Anal. Biochem. 33, 28 (1970)
- (127) SHAW, D.J.  
"Introduction to Colloid and Surface Chemistry",  
2nd ed. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., Lon-  
don. (1975) p. 26.

- (128) GOLLWITZER, R., TIMPL, R., BECKER, W.  
y FURTHMAYR, H.  
Am. J. Biochem. 28, 497 (1972)
- (129) GRAY, W.P. y HARTLEY, B.S.  
Biochem. J. 89, 59 (1963)
- (130) GROSS, C. y LABOUESSE, B.  
Eur. J. Biochem. 7, 463 (1969)
- (131) SEILER, N.  
En "Methods of Biochemical Analysis", Vol. 18.  
(Glick, D., ed.). Interscience Publishers (John  
Wiley and Sons, New York). (1970) p. 263.
- (132) AYUSO, R.  
Tesis Doctoral. Universidad de Madrid, Facultad  
de Ciencias (Noviembre, 1972)
- (133) WOODS, K.R. y WANG, K.T.  
Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)
- (134) BENNETT, J.C.  
En "Methods in Enzymology", Vol. XI. (Hirs, C.H.W.,  
ed.). Academic Press, New York. (1967) p. 330.
- (135) MIHALYI, E. y TOWNE, D.W.  
Thromb. Res. 8, 1 (1976)
- (136) ABLONDI, F.B., HAGAN, J.J., PHILIPS, M. y  
DE RENZO, E.C.  
Arch. Biochem. Biophys. 82, 153 (1959)
- (137) IRREVERRE, F.  
Biochim. Biophys. Acta 111, 551 (1965)
- (138) DIXON, H., KAUFFMAN, D.L. y NEURATH, H.  
J. Biol. Chem. 233, 1373 (1958)
- (139) PLOW, E.F. y EDGINGTON, T.S.  
J. Clin. Invest. 56, 30 (1975)

- (140) REGAÑON, E. y AZNAR, J.  
Comunicación personal. Residencia Sanitaria de  
S.S. "La Fé" de Valencia.
- (141) BANG, N.U., FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N. y  
SHERRY, S.  
J. Clin. Invest. 41, 935 (1962)
- (142) HIRSH, J., FLETCHER, A.P. y SHERRY, S.  
Am. J. Physiol. 209, 415 (1965)
- (143) LATALLO, Z.S., FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N. y  
SHERRY, S.  
Am. J. Physiol. 202, 681 (1962)
- (144) LATALLO, Z.S., BUDZYNSKI, A.Z., LIPINSKI, B. y  
KOWALSKI, E.  
Nature 203, 1184 (1964)
- (145) LARRIEU, M.J., MARDER, V.J. e INCEMAN, S.  
Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl. 20, 215 (1966)
- (146) MARDER, V.J. y SHULMAN, N.R.  
J. Biol. Chem. 244, 2120 (1969)
- (147) FERRY, J.D., KATZ, S. y TINOCO Jr., I.  
J. Polym. Sci. 12, 509 (1954)
- (148) WALLEN, P. e IWANAGA, S.  
Biochim. Biophys. Acta 154, 414 (1968)
- (149) MAGNUSSON, S.  
Methods in Enzymology. Vol. XIX. Proteolytic Enzy-  
mes (Perlman, G.E. y Lorand, L., Eds.) Academic  
Press (N.Y.) pag. 157, 1970.
- (150) PECHET, L. y ALEXANDER, B.  
Biochemistry 1, 875 (1962)
- (151) MIHALYI, E. y GODFREY, J.E.  
Biochim. Biophys. Acta 67, 90 (1963)

- (152) LATALLO, Z.S., TEISSEYRE, E., WEGRZYNOWICZ, Z. y KOPEC, M.  
Scand. J. Haematol. Suppl. 13, 15 (1971)
- (153) CANFIELD, R.E., DEAN, J., NOSSEL, H.L., BUTLER Jr., V.P. y WILNER, G.D.  
Biochemistry 15, 1203 (1976)
- (154) MIHALYI, E.  
Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl. 39, 43 (1970)
- (155) ALBERT, A. y MIHALYI, E.  
Datos no publicados. Comunicación personal.
- (156) GAFFNEY, P.J.  
Haemostasis 6, 2 (1977)
- (157) HARFENYT, E.J. y CANFIELD, R.E.  
Biochemistry 14, 4110 (1975)
- (158) MOSESSON, M.W., FINLAYSON, J.S., UMFLEET, R.A. y GALANAKIS, D.  
J. Biol. Chem. 247, 5210 (1972)
- (159) PRENTICE, C.R.M.  
Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 634 (1975)
- (160) IWAMOTO, M., ABIKO, Y. y SHIMIZU, M.  
J. Biochem. (Tokyo) 64, 759 (1968)
- (161) KEIL, B.  
"The Enzymes" (Boyer, P.D., Ed.) Vol. III. Academic Press, New York, 249 (1971).
- (162) BLOMBÄCK, B. HESSEL, B. y HOGG, D.  
Thromb. Res. 8, 639 (1976)
- (163) EHRLICH, P., SHULMAN, S. y FERRY, J.D.  
J. Amer. Chem. Soc. 74, 2258 (1959)
- (164) MIHALYI, E.  
Acta Chem. Scand. 4, 317 (1950)

- (165) MIHALYI, E.  
Acta Chem. Scand. 4, 334 (1950)
- (166) LORAND, L. y CHENOWETH, D.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 1247 (1969)
- (167) KEMP, G., FURLAN, M. y BECK, E.A.  
Thromb. Res. 3, 553 (1973)
- (168) EISELE, J.W. y MIHALYI, E.  
Thromb. Res. 6, 511 (1975)
- (169) CHEN, R. y DOOLITTLE, R.F.  
Biochemistry 10, 4496 (1971)
- (170) FEDDERSEN, J.C. y GORMSEN, J.  
Thrombos. Haemostas (Stuttg.) 36, 27 (1971)