

L'ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FIBRINOGEN, FACTOR CLAU DELS PROCESSOS NORMALS I PATOLÒGICS DE COAGULACIÓ SANGUÍNA I DE FIBRINÒLISI

ARMAND ALBERT

Institut de Química-Física del C.S.I.C. Madrid

Qualsevol agressió o canvi en les característiques de la superfície que envolta o tanca la sang, té com a efecte que les plaquetes es transformin ràpidament i s'adhereixin al lloc danyat i que a més s'agreguin per obturar la fuita o la lesió. Però l'estabilització d'aquest tap precari és deguda al fet que el fibrinogen, mitjançant un procés complex d'actuació d'una sèrie d'enzims, el resultat final del qual és la trombina, es transforma per l'acció d'aquesta en fibrina insoluble. Així, una proteïna soluble de plasma s'associa i constitueix un polímer ramificat que serà l'esquelet del coàgul i el fi últim del procés de coagulació.

Aquest coàgul es forma en el punt on se'l necessita perquè la superfície de les plaquetes transformades actua com a catalitzador i activa in situ la formació de trombina; d'aquesta manera evita el progrés de la coagulació i l'oclusió dels vasos lesionats. D'altra banda, el coàgul format és una solució transitòria; quan ja no fa falta, ha d'ésser destruït per tal d'evitar les perturbacions que la seva presència causaria en el flux hidrodinàmic o el cas més greu de separar-se de la paret i constituir aleshores un èmbol, la qual cosa pot ésser fatal si obstrueix un vas petit però fonamental en el sistema. Per impedir aquestes perturbacions, existeix un altre procés, la fibrinòlisi, que es dispara simultàniament al de coagulació i que, mitjançant l'aparició d'una proteasa anomenada plasmina, desfà l'entramat de fibrina que s'havia format durant la coagulació. Aquests dos processos, complementaris i d'alguna manera oposats, són bàsics per a l'equilibri homeostàtic del sistema cardíoc-vascular, és a dir, entre el volum sanguini i la seva fluïdesa. Qualsevol irregularitat en el transcurs dels processos pot modificar aquest equilibri i provocar l'aparició de situacions patològiques importants.

Els estats d'hipercoagulabilitat poden ésser deguts a una disminució de la fibrinòlisi –com en l'arteriosclerosi avançada o en el cas de tumors malignes– o, al contrari, a un augment d'aquest mecanisme produït per l'aparició sobtada de substàncies precoagulants en el torrent sanguini; aleshores es pot presentar una coagulació intravascular localitzada (trombosi) o bé de manera disseminada (CID).

La situació oposada, amb l'aparició d'estats hemorràgics, pot ésser causada tant per un augment de la fibrinòlisi com per un defecte en els processos de coagulació o per una patologia a nivell molecular del mateix fibrinogen.

Encara que avui dia disposem de tècniques terapèutiques que permeten influir en ambdós processos i de mètodes analítics quantitius de gran precisió, existents als centres hospitalaris més ben dotats, la veritat és que àdhuc l'estudi quantitatiu dels factors que intervenen en el conjunt coagulació-fibrinòlisi no permet, sovint, explicar el possible desenvolupament del procés resultant. Caldrà fer un estudi a fons dels mecanismes d'acció dels diversos components del sistema i dels aspectes químic-físics implicats (desconeguts actualment en bona part).

Hem d'assenyalar, però, que en els darrers anys s'ha progressat extraordinàriament en la comprensió dels esdeveniments centrals, és a dir, la formació de fibrina i la fibrinòlisi, gràcies a l'enorme esforç realitzat en l'estudi de la molècula de fibrinogen i de les implicacions a nivell molecular d'aquests processos.

El coneixement de l'estructura del fibrinogen es va plantejar, fa uns vint-i-cinc anys, com un repte als químic-físics de proteïnes, amb l'esperança que el seu estudi contribuiria a la comprensió dels fets clau en les malalties cardíco-vasculars.

Els aspectes principals del problema es poden resumir en els punts següents:

- 1) Forma global de la molècula de fibrinogen i de fibrina.
- 2) Estructura química i seqüència de les cadenes polipeptídiques constituents.
- 3) Localització i distribució de les cadenes polipeptídiques dins la molècula que expliquin les interaccions i l'ordenació dels monòmers de fibrina per a constituir el gel tridimensional.
- 4) Possible funció dels hidrats de carboni en la molècula.

Hom ha pogut donar resposta a aquestes preguntes —a unes més que a d'altres—, amb la qual cosa sembla que ja es pot establir una correlació força ajustada entre l'estructura i la missió fonamental del fibrinogen, o sigui, constituir primer un gel estructural i químicament fort, capaç d'estabilitzar el coàgul sanguini i alhora aconseguir que aquest coàgul sigui fàcilment vulnerable als enzims proteolítics (en especial la plasmina) perquè, en conseqüència, es degradi amb rapidesa quan ja no se'l necessita.

El fibrinogen és una proteïna complexa. De pes molecular alt (340.000 daltons), és constituïda per tres parelles de cadenes (A α , B β , γ) 2, unides entre elles per vint-i-nou enllaços disulfur que a més contenen un 3 i un 4 per cent d'hidrat de carboni de composició química semblant al d'altres glicoproteïnes.

La seva forma o estructura global ha estat molt controvertida durant la darrera dècada, atès que tant els resultats dels estudis hidrodinàmics com els de microscòpia electrònica eren sovint contradictoris i dependents de les tècniques emprades. Però a través dels estudis de fragmentació química i enzimàtica amb plasmina i tripsina principalment, s'arriba a la conclusió que, com ja ho indicaren Hall i Sleyter en llur treball clàssic (1959) de microscòpia electrònica, la molècula de fibrinogen deu estar constituïda per nòduls o zones globulars interconnectades entre elles per dues llargues zones fibroses que presenten alguns punts fàcilment vulnerables a l'atac d'enzims proteolítics, independentment de llur especificitat. Els estudis de degradació enzimàtica demostraren l'existència de dos tipus de nòduls de caràcters físics i químics diferents, els anomenats D, de pes molecular més elevat i els E, que són aproximadament la meitat més petits que els anteriors. La separació i l'estudi químic-físic d'aquest nòdul, permeteren demostrar que el fibrinogen conté dos nòduls D units a un nòdul E.

Diversos estudis de degradació química amb bromur de cianogen, permeteren aïllar un nòdul o fragment que contenia els sis aminoàcids N-terminals de la molècula i que era un dímer unit per ponts de disulfur. Aquest nus disulfur, que contenia intacta quasi la meitat dels enllaços en un quinze per cent de la massa de la molècula, era molt semblant –tal com es va demostrar– tant químicament com immunològicament, al fragment E, en el qual és contingut.

Un altre aspecte que rebé un gran impuls amb la degradació química de la molècula, fou el coneixement de la composició de les cadenes de fibrinogen. Hom pogué determinar la seqüència dels 247 aminoàcids, que constituïen cada una de les dues meitats del nus disulfur, encara que no fa gaires anys que s'ha arribat a completar la tasca ben costosa d'establir la seqüència sencera de les tres cadenes distintes del fibrinogen.

Dos laboratoris, cadascun per la seva banda, han determinat l'estructura covalent completa del fibrinogen. La cadena A- α conté 610 restes d'aminoàcids, la B- β en conté 461 i la γ 411, en un total de 1.482 a cada una de les dues hemimolècules. L'estructura dimèrica del fibrinogen, palesada per la seva composició, no s'havia pogut demostrar fins fa ben pocs anys, malgrat els nombrosos intents realitzats. Al nostre laboratori hem aconseguit separar mitjançant la reducció controlada de ponts disulfur en presència d'urea concentrada, les dues meitats de la molècula i reconstituir després la molècula nativa amb la reoxidació i l'eliminació de l'agent dissociador. La molècula conté, a més, uns 10.000 daltons de carbohidrats organitzats en quatre conjunts ramificats units a través de residus d'asparagina, dos en les cadenes γ properes a l'extrem N-Terminal (dins el domini E) i dos en les β a la zona propera al C-Terminal incloses en els nòduls D. Un dels aspectes més importants des del punt de vista estructural que el coneixement de la seqüència d'aminoàcids ha permès establir, és l'existència de dos anells disulfur a cada meitat de la molècula, els quals uneixen mitjançant tres enllaços disulfurs cada cadena amb les altres dues. Entre els anells hi ha 111 residus a les tres cadenes, amb unes característiques químiques que permeten esperar una estructura α -helicoidal més fortament enrotllada o superenrotllada que constituïria les zones fibroses que connecten els tres nòduls i que tindrien una llargada de 15 nm. Diversos estudis de difracció de raigs X confirmen aquesta deducció, la qual concorda amb les dimensions obtingudes per diferents mètodes químic-físics. La molècula hidratada a partir d'estudis de microscòpia recents, té unes dimensions globals equivalents a un cilindre o vareta d'uns 45 nm de llarg i 9 nm de diàmetre. I finalment, quant a l'estructura, assenyallem que, si el nòdul central dimèric està fortament estructurat per abundants ponts disulfur, els dos nòduls extrems tenen una bona part de les cadenes alfa amb una conformació descabdellada, que constitueixen uns apèndixs de caràcter polar, fàcilment separables mitjançant l'acció de proteases.

La transformació del fibrinogen en fibrina és deguda a la separació, per acció de la trombina, de dos parells de petits pèptids A i B que corresponen als extrems N-terminals de les cadenes A i B respectivament, del fibrinogen i que tenen una càrrega neta negativa elevada. Així, el nòdul central passarà d'una càrrega neta negativa elevada a pràcticament nul·la a causa de la pèrdua dels pèptids A, i arribarà a un valor positiu quan els pèptids B, que se separaran més tard, siguin eliminats del fibrinogen. Els dominis extrems tenen una càrrega neta constant de -4, per la qual cosa a la fibrina apareix una determinada complementaritat electrostàtica que no trobem al fibrinogen i que podria explicar l'agregació dels monòmers de fibrina. En principi, el domini central d'una molècula s'uniria a un domini extrem d'una altra i el

domini central d'aquesta darrera s'uniria aleshores a l'extrem de la primera; així s'iniciaria una doble cadena de fibrina polímer, com es pot observar emprant la microscòpia electrònica.

Hom disposa d'informació suficient per a avalar l'existència d'aquest tipus de polimerització en principi i degut només a la separació dels pèptids A. Les associacions laterals d'aquestes protofibril·les per a constituir el polímer tridimensional de fibrina es corresponen amb la separació dels pèptids B. Aquestes interaccions de caràcter feble són reforçades mitjançant la formació d'enllaços covalents de tipus peptídic per l'acció de l'anomenat factor XIII (una transaminasa) que estableix dos enllaços covalents entre els extrems C-Terminals de les cadenes γ de dues molècules adjacents de la cadena (cap-cua) i diversos enllaços entre les cadenes alfa de molècules unides lateralment. Així, la ruptura de l'entramat de fibrina del coàgul estabilitzat, només és possible per proteòlisi amb endopeptidases.

Alguns estudis recents amb polipèptids sintètics, els quals tenen la seqüència d'alguns trams de la molècula, indiquen que l'associació de les molècules de fibrina és deguda a l'existència de punts o zones localitzables en aquestes molècules que s'interaccionen d'una manera específica. Hom ha descobert que en els dominis D hi ha un lloc (a) permanentment actiu, que correspon al final de la cadena γ , capaç d'unir-se específicament a un lloc (A); per tant, hi ha dos llocs d'aquest tipus per a cada domini central. D'altra banda, s'ha vist que la separació dels pèptids D activa o descobreix altres llocs (B) en el mateix domini, els quals són capaços d'unir-se a llocs (b) dels dominis D. Sembla que aquests darrers només són eficaços quan dos dominis D estan units i ja formen una cadena.

La correlació entre la naturalesa química o seqüència d'aminoàcids dels llocs d'interacció i llur capacitat d'unir les molècules de fibrina, es palesà, a més, amb l'existència de fibrinògens patològics incapaços de coagular o amb una capacitat limitada. Ja fa anys que s'han descobert algunes malalties congènites de coagulació, degudes al fet que l'organisme produeix fibrinògens que presenten canvis de la seqüència d'aminoàcids propers a l'extrem N-Terminal de la cadena α ; per exemple, la substitució d'una arginina a la posició 19 de la cadena A α per una serina produeix l'anomenat fibrinogen Detroit.

Un altre tipus de desordres de coagulació de caràcter adquirit, relacionats amb trastorns hepàtics, s'ha observat que correspon a canvis en els conjunts d'hidrats de carboni units a la molècula de fibrinogen. Les molècules que presenten retard de coagulació tenen un nombre més alt de restes d'àcid siàlic que el fibrinogen normal.

L'eliminació mitjançant enzims apropiats (neuraminidases) de l'àcid siàlic de la molècula normal, demostra que hi ha correlació entre la quantitat d'aquest àcid i la velocitat de coagulació del fibrinogen. Com menys carga negativa presenti l'hidrat de carboni, més ràpida serà la coagulació.

Tot el que hem exposat posa en relleu que una estructura polinodular com la del fibrinogen permet la formació d'un entramat molt estable sense que calguin grans canvis moleculars ni estructurals entre el fibrinogen soluble i la fibrina que polimeritza espontàniament.

L'arquitectura del coàgul de fibrina ofereix la particularitat de presentar fortes unions intermoleculars a nivell dels dominis nodulars i canals pràcticament buits, només ocupats per les connexions interdominis que contenen enllaços fàcilment tallats per agents proteolítics. Aquests canals permeten, d'una banda, l'adsorció d'altres proteïnes, entre les quals trobem el plasminogen (precursor de la plasmina), sense que s'alteri l'entramat molecular de la fibrina; i per l'altra, la difusió de molècules que

apareixen després de la coagulació, com els activadors de la plasmina.

Els mecanismes d'actuació del sistema fibrinolític sembla que imposen precisament aquesta adsorció prèvia del plasminogen a la fibrina per evitar l'acció de l'anti-plasmina, la qual inactivaria l'enzim; d'aquesta manera es protegeix el fibrinogen circulant.

La destrucció d'un entramat de tipus globular, és a dir, el resultant de la unió de proteïnes globulars, és molt difícil d'assolir mitjançant enzims proteolítics; en canvi, per destruir el gel de fibrina, la plasmina sols ha de tallar un nombre relativament petit d'enllaços a les zones fibroses que s'uneixen a les zones globulars. Solubilitzar un filament de fibrina requereix només tallar dues connexions (tres enllaços peptídics en cada cas) entre uns deu monòmers de fibrina, ja que les protofibrilles d'aquesta grandària o polímers intermedis, formats a les primeres etapes de la coagulació, són solubles. Per tant, en condicions fisiològiques, la lisi del coàgul de fibrina és una tasca relativament senzilla gràcies a l'estructura del fibrinogen.

Els productes que s'obtenen per degradació de la fibrina amb plasmina fisiològica, no són diferents dels obtinguts del fibrinogen o de la fibrina no estabilitzada per acció del factor XIII, excepte que del coàgul fisiològic s'observen fragments «D dobles». En condicions suaus també s'han pogut aïllar fragments D₂E.

Tots aquests coneixements permeten que les investigacions actuals, especialment les encaminades a l'estudi de la fibrinòlisi, tinguin una base molecular que faciliti una interpretació més profunda dels resultats i una perspectiva més àmplia a l'hora de dissenyar noves experimentacions.

Per exemple, la dificultat de lisar coàguls envellits sembla estar relacionada amb l'adsorció del plasminogen i amb la dificultat més gran de lisar fibrina estabilitzada des de l'exterior.

L'ús d'activadors de la plasmina per a la lisi de trombes no accessibles quirúrgicament no passarà de tenir un caràcter empíric i, per tant, arriscat, mentre no es conegui més bé el mecanisme a nivell molecular de la fibrinòlisi.

Encara que el fet de conèixer més bé l'estructura del factor central en la coagulació no ha estat la solució dels problemes d'etiologia i de terapèutica que plantegen les malalties cardíco-vasculars, és evident que s'ha avançat molt i que els grans esforços realitzats en l'estudi del fibrinogen contribuirien decisivament a una comprensió més profunda dels processos implicats, tant en les situacions normals com en les patològiques.