

Fibrinogénio e Fibrinólise. Relevância do Fibrinogénio Plasmático

J. Carvalho de Sousa, Fátima Carriço**, Cristina Duarte****

O Fibrinogénio (Fg) plasmático é uma proteína central no sistema hemostático. A sua função é reconhecida como sendo a formação do "esqueleto" do coágulo sanguíneo, devido à acção da Trombina sobre a molécula dimérica trinodular desta proteína, permitindo a sua polimerização longitudinal e transversal. Por outro lado, o sistema fibrinolítico actua dissolvendo esta rede de fibrina, através da acção da plasmina sobre o Fg polimerizado e covalentemente ligado.

As alterações moleculares do Fg condicionam portanto qualquer destas funções, modificando as possibilidades de actuação enzimática. Neste trabalho são apresentadas as principais variantes moleculares conhecidas do Fg, correlacionando-se com as alterações de função implicadas.

O Fg pode ocorrer em grande número de formas moleculares diferentes, incluindo variantes hereditárias e adquiridas. As hereditárias correspondem a polimorfismos das cadeias alfa e beta e a mutações das cadeias alfa, beta e gama. As adquiridas resultam de transcrição alternativa das cadeias gama, modificações pós-transcricionais e degradação proteolítica. Qualquer delas, resulta em variações da função da molécula, correspondendo a alterações da fibrinogénese ou a alterações da fibrinólise. São descritos os principais polimorfismos e mutações, correspondendo aos sítios funcionais da molécula do Fg com as alterações verificadas.

Os estudos moleculares do Fg para identificar indivíduos em risco de trombose ou de discrasia hemorrágica podem vir a revelar-se muito úteis.

* Professor Auxiliar Agregado de Patologia Clínica da F.M. L.
Assistente Hospitalar graduado do H.S. M.

** Assistente Hospitalar do H. S. M.

***Interna do Complementar Graduada do H. S. M.

Fibrinogénio e Fibrinólise. Relevância do Fibrinogénio Plasmático.

Introdução

O fibrinogénio plasmático intervém na coagulação do sangue a vários níveis. Depois da cascata de processos de activação enzimática, culminando na formação de trombina, a molécula do fibrinogénio circulante é transformada por aquela enzima numa rede de fibrina, constituindo o gel que permite a paragem da hemorragia nos vasos lesados. Posteriormente, irá dar-se o processo fibrinolítico em que essa mesma fibrina, à superfície dos vasos sanguíneos, é dissolvida enzimaticamente por outra enzima, a plasmina (1). Qualquer destes dois processos depende em elevado grau das moléculas de fibrinogénio, sendo necessária a sua completa normalidade para que ocorram sem alterações. Quando existem, estas alterações podem traduzir-se

por processos de diátese hemorrágica ou por uma tendência trombótica clinicamente evidente.

A molécula do fibrinogénio plasmático é uma molécula trinodular, dimérica, com três pares de cadeias e com 340 KDa de peso molecular (2) (Figura 1).

Existe claramente um domínio central, designado por domínio E, e dois domínios periféricos designados por domínios D. O seu peso molecular é de cerca de 340 KDa, correspondente à soma dos pesos de 6 cadeias, sendo 2 cadeias alfa, 2 cadeias beta e 2 cadeias gama (Figura 1).

Em qualquer destas cadeias existem locais funcionalmente muito importantes, porquanto correspondem a locais de fixação de outras moléculas que interagem com o fibrinogénio. São os casos da Trombina (FIIa), da Plasmina, do Activador tecidual do plasminogénio (t.PA), das

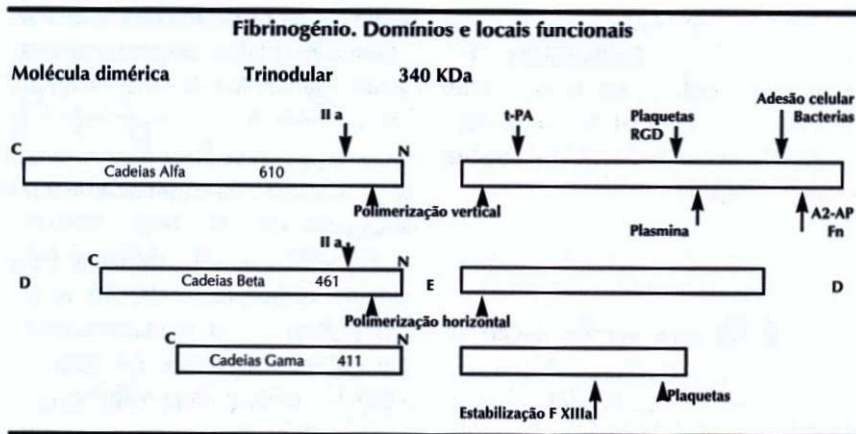


Fig. 1: Representação esquemática da molécula do fibrinogénio. Domínios e locais funcionais. Para abreviaturas - v.texto.

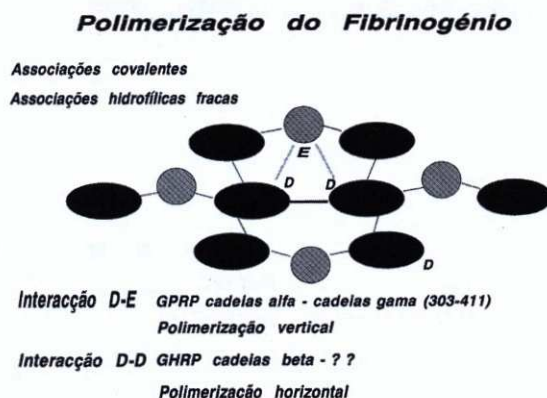


Fig. 2: Polimerização do Fibrinogénio. Ligações D-E e D-D.

plaquetas, da alfa2-antiplasmina (A2-AP), da Fibronectina (Fn) e do Factor XIII (FXIII) (3). Por outro lado, existem também locais funcionais importantes para a própria modificação fisiológica da molécula.

A formação da fibrina consiste na polimerização das moléculas do fibrinogénio, através da sua associação umas às outras. Ela depende da integridade de locais funcionais nas cadeias alfa e cadeias beta. A estabilização posterior dos polímeros iniciais depende também da fixação apropriada do FXIII activado (FXIIIa) para o que é fundamental a estrutura das cadeias gama (4) (Figura 1).

As alterações moleculares do fibrinogénio condicionam assim a sua participação na hemostase, podendo verificar-se alterações de um ou mais destes processos fisiológicos.

Formação de fibrina e sua dissolução

O fibrinogénio é inicialmente clivado pela trombina a nível das suas cadeias alfa e beta. A trombina, como protease que é, cliva as ligações Arg-Gly nos extremos

amino-terminais, centrais, das cadeias alfa e beta. Esta clivagem expõe a sequência GPRP nas cadeias alfa e a sequência GHRP nas cadeias beta, que são fundamentais para a polimerização do fibrinogénio. É conhecido que os péptidos sintéticos que mimetizam a sequência GPRP das cadeias alfa dificultam ou impedem a polimerização vertical do fibrinogénio, enquanto que a acção de péptidos sintéticos que mimetizam a sequência GHRP das cadeias beta do fibrinogénio não tem grande efeito inibidor (5).

Estas clivagens libertam dois fragmentos peptídicos da cada uma destas cadeias alfa e beta, designados respectivamente por Fibrinopéptidos A e B. A libertação de FpA é mais rápida e mais importante logo de início, seguindo-se-lhe a libertação de FpB (6). A concentração plasmática de qualquer deles pode ser determinada laboratorialmente, sendo normalmente muito baixa. O aumento da sua concentração no plasma traduz portanto um acentuado poder de formação do coágulo *in vivo*, traduzindo a acção da Trombina sobre o fibrinogénio.

Em estudos mais aprofundados podem também utilizar-se outras tecnologias para estudar a constituição molecular destes

Estabilização da rede de Fibrina

F XIII a Ligações peptídicas covalentes
Resistência mecânica, química e enzimática

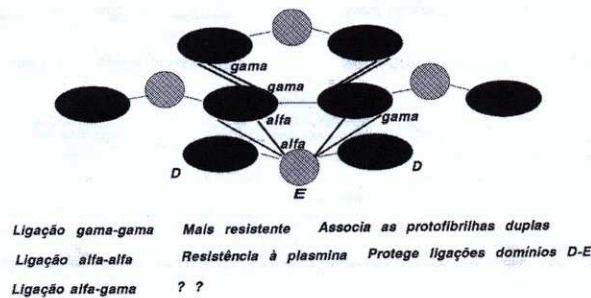


Fig. 3: Estabilização da rede de fibrina. Ligações gama-gama, alfa-gama e alfa-alfa, por acção do FXIIIa.

péptidos do fibrinogénio. Assim, em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eles podem dar uma indicação de constituição anormal e contribuir para a classificação de uma anomalia molecular das cadeias alfa ou beta, que implica uma alteração da clivagem proteolítica pela Trombina (7).

Estas modificações das cadeias alfa e beta do fibrinogénio, implicam a transformação da sua carga eléctrica nos domínios centrais das moléculas, que fazem com que a sua associação se possa iniciar. Começa então a polimerização do fibrinogénio, com estabelecimento de ligações entre os domínios D e E de moléculas adjacentes. Esta associação permite a sobreposição vertical de moléculas de fibrinogénio constituindo-se as primeiras protofibrilhas da fibrina (Figura 2).

As ligações D/E são ligações covalentes, fortes entre cadeias alfa e cadeias gama. Mais tarde inicia-se também a polimerização horizontal do fibrinogénio em que intervem os domínios D/D de moléculas adjacentes. Implicam as cadeias beta e partes ainda não identificadas do fibrinogénio. São ligações mais fracas, hidrofílicas, mas que juntamente com as

anteriores asseguram a formação de uma rede de fibrina estável (8).

Esta rede de fibrina vai ainda sofrer modificações suplementares que lhe proporcionam resistência mecânica, física e química, incluindo a enzimática. Designa-se este processo por "estabilização" da fibrina. Esta estabilização é assegurada pela contribuição do FXIIIa que cataliza a formação de ligações peptídicas, covalentes, entre duas cadeias gama de moléculas adjacentes. As ligações gama-gama, entre resíduos de Glutamina e Lisina, são pois as mais importantes para dar estabilidade à fibrina (9).

A catálise pelo FXIIIa é um processo complexo em que intervem também a activação proteolítica deste factor pela Trombina, facilitada pelo Fibrinogénio e pelos monómeros de fibrina (10). A separação de cadeias do FXIII, indispensável à sua acção, é também facilitada pelo Fibrinogénio. Numa fase posterior a fixação de FXIII adicional é dificultada pela presença de fibrina já estabilizada. Existe portanto uma autoregulação deste complexo processo pelo Fibrinogénio, Trombina, monómeros de fibrina e FXIII.

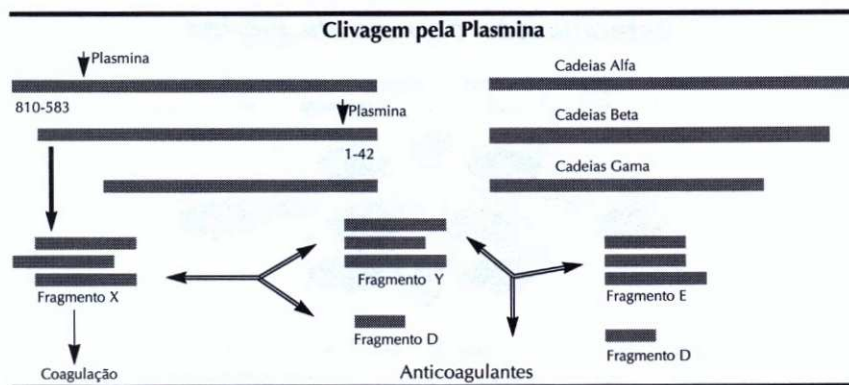


Fig. 4: Clivagem do Fibrinogénio pela Plasmina. Origem dos Produtos de Degradação do Fibrinogénio.

Contudo, o FXIIIa cataliza também a formação de ligações entre cadeias alfa (alfa-alfa) e entre as cadeias alfa e cadeias gama (alfa-gama) (Figura 3).

Como atrás ficou salientado é fundamental que a estrutura molecular das cadeias gama seja normal para o estabelecimento destas interacções. Em casos de anomalias na extremidade carboxi-terminal das cadeias gama, a estabilização da fibrina resulta anormal, podendo então existir uma alteração da hemostase caracterizada por debilidade do coágulo e maior facilidade da sua dissolução.

Após a constituição da rede de fibrina polimerizada, estável e insolúvel, inicia-se a sua dissolução enzimática, que se designa por fibrinólise. A fibrinólise, deve-se à acção da Plasmina sobre a fibrina (Figura 4). De facto, a Plasmina é capaz de clivar as cadeias alfa e beta do fibrinogénio. A Plasmina não cliva as cadeias gama.

Na molécula do fibrinogénio, a fibrinogénólise efectuada pela plasmina implica a clivagem do terço terminal das cadeias alfa e dos primeiros 42 aminoácidos das cadeias beta (11) (Figura 4). Resta portanto um fragmento molecular, o fragmento X, que por si só é ainda capaz de

coagular lentamente. A degradação proteolítica posterior deste fragmento X dá origem à formação de fragmentos menores, o fragmento Y e o fragmento D, que posteriormente podem ainda ser clivados em fragmento E e um outro fragmento D (12) (Figura 4). Estes fragmentos Y, D e E tem acção anticoagulante, interferindo também com a fixação das plaquetas ao coágulo de fibrina.

A clivagem da fibrina é essencialmente idêntica à clivagem do fibrinogénio. Contudo, como já se encontram estabelecidas associações estáveis entre as moléculas, libertam-se fragmentos constituídos por partes de várias moléculas mas de conformação idêntica aos descritos Y, D e E. No final, a degradação da fibrina permite identificar os fragmentos DDE associados, que constituem os Dímeros D. Estes, determinados laboratorialmente, são indicadores da acção da plasmina sobre uma rede de fibrina estável, já covalentemente ligada.

O estudo laboratorial comum da fibrinogénese e fibrinólise pode portanto efectuar-se na maioria dos laboratórios com recurso a metodologias simples (Quadro I).

Desde os testes gerais, incluindo o doseamento imunológico do fibrinogénio e

Quadro I**Estudo laboratorial da Fibrinogénese e Fibrinólise**

Determinação do fibrinogénio - Método biológico e imunológico

Tempo de Reptilase

Tempos de Protrombina e Tromboplastina Parcial

Fibrinopéptido A. Fibrinopéptido B

Tempo de lise da Euglobulinas (com estimulação)

Plasminogénio e Alfa2-antiplasmina

Activador Tecidual do plasminogénio (com estimulação)

Dímeros DDE Qualitativo e Quantitativo. Fragmentos Y, D e E

Fragmento B (15-42)

Estudo genético

a determinação da sua taxa através do método funcional coagulométrico, os Tempos de Protrombina e de Tromboplastina Parcial, podem ainda estudar-se o FpA e a conversão do fibrinogénio em fibrina sem intervenção da trombina (Tempo de Reptilase).

A fibrinólise é avaliada na sua globalidade com o Tempo de Lise das Euglobulinas e com a determinação dos Dímeros D, qualitativa e quantitativa. Deve ainda fazer-se a determinação dos seus diversos componentes, como o t-PA, plasminogénio e alfa2-antiplasmina (13) (Quadro I).

Variantes moleculares do fibrinogénio

Mesmo no indivíduo normal existem milhares de variantes fisiológicas da molécula do fibrinogénio. Calcula-se que existem pelo menos 14 variantes regionais da molécula, o que em todas as suas combinações possíveis daria mais de 500.000 combinações possíveis (14).

Nem todas estas variantes são

hereditárias. Existem importantes mecanismos de síntese anormal do Fibrinogénio dando modificações hereditárias da molécula e alterações não hereditárias (Quadro II). De entre as não hereditárias, podemos isolar três mecanismos fundamentais de alteração molecular: a transcrição alternativa das cadeias gama, as modificações pós-transcricionais e a degradação proteolítica da molécula.

A transcrição alternativa das cadeias gama ocorre para cerca de 10% do fibrinogénio normal e traduz-se num maior comprimento de algumas cadeias gama, o que implica uma diminuída interacção com as plaquetas sanguíneas. As modificações pós-transcricionais afectam as cadeias alfa, beta e gama, podendo constituir-se por fosforilação das cadeias alfa, sulfatação e hidroxilação das cadeias beta e glicosilação das cadeias beta e gama (15). De todas estas alterações, as únicas que estão bem associadas a patologia é a glicosilação das cadeias beta e gama que ocorre na diabetes e na doença hepática (cirrose hepática) e que se traduz por um aumento da carga

Quadro II

Variantes Moleculares do Fibrinogénio		
1. Não hereditárias:		
A. Transcrição	B. Modificação	C. Degradação
Alternativa	Pós-transcricional	Proteolítica
Cadeias Gama	Fosforilação cadeias Alfa Sulfatação cadeias Gama Hidroxilação cadeias Beta Glicosilação cadeias Beta e Gama	Cadeias Alfa Cadeias Gama
2. Hereditárias		
A. Afibrinogenémia	B. Polimorfismos	C. Mutações
Gene normal	Cadeias Alfa e Beta	Cadeias Alfa e Beta
Défice secreção	Interação síntese Fg	Disfibrinogenémias

negativa da molécula por aumento do ácido siálico ou de carbo-hidratos. Na prática, estes fibrinogénios mostram uma capacidade de polimerização diminuída dando clinicamente uma alteração semelhante ao défice de FXIII da coagulação (16).

Finalmente, a degradação proteolítica pode ocorrer nas cadeias alfa ou gama. A degradação proteolítica das cadeias gama afecta geralmente o terço distal das cadeias e implica uma redução da interacção do fibrinogénio com as plaquetas. A degradação proteolítica das cadeias alfa ocorre no terço médio e terço periférico das cadeias e implica uma diminuição da estabilidade do coágulo. No indivíduo normal esta degradação proteolítica ocorre normalmente para as cadeias alfa, sendo cerca de 30% do fibrinogénio circulante uma molécula parcialmente degradada por proteases. Na sua expressão normal não influencia decisivamente a coagulação do sangue.

Apenas em alguns estados hipermetabólicos em que as proteases circulantes podem aumentar, e que ela se traduz por alteração biologicamente significativa (17).

A degradação proteolítica das cadeias alfa implica portanto uma menor estabilidade do coágulo enquanto que a degradação proteolítica das cadeias gama se traduz por uma menor interacção do fibrinogénio com as plaquetas (18).

As variantes moleculares hereditárias são também várias (Quadro II). A afibrinogenémia hereditária é uma das situações conhecidas. Ela pode ser total ou parcial mas em qualquer dos casos os estudos genéticos efectuados até ao presente mostram um gene do fibrinogénio normal (19). Em alguns casos parece existir um aumento do armazenamento hepático do proteína, possivelmente devido a uma alteração estrutural não identificada. Esta poderá condicionar um defeito de secreção hepática do fibrinogénio.

Estão descritos polimorfismos varios das cadeias alfa, beta e gama (Quadro II). Contudo, apenas dois casos estão amplamente confirmados. Trata-se de um polimorfismo do resíduo 312 das cadeias alfa (Thr/Ala) e de um polimorfismo do resíduo 448 das cadeias beta (Arg/Lys) (20). Apenas a substituição Arg/Lys nas cadeias beta do fibrinogénio parece ter importância clínica. De facto, este polimorfismo está directamente relacionado com outro local polimórfico para a sonda Hae III, da região promotora do gene do fibrinogénio, que se sabe estar relacionado com a taxa de fibrinogénio plasmático (21). Assim, é possível que este polimorfismo da região codificante das cadeias beta influencie também a taxa de fibrinogénio, tendo uma importância fundamental na constituição do risco trombótico associado à elevação da taxa de fibrinogénio.

Finalmente, existem numerosas mutações das cadeias alfa, beta e gama. Actualmente, estão descritas cerca de 80 alterações estruturais correspondentes a mutações genéticas e alterando a sequência de aminoácidos das cadeias de fibrinogénio (22). As melhor conhecidas são as das cadeias alfa, implicando anomalias diversas da clivagem pela trombina. Aliás, como a maioria dos estudos moleculares do fibrinogénio são originados por alterações dos testes de coagulação mais utilizados, são quase sempre alterações da interacção com a

Trombina que são descritas. A análise dos Fibrinopéptidos A e B por metodologias mais específicas tem ajudado ao esclarecimento de muitas destas alterações.

Algumas destas mutações são também responsáveis por alterações da polimerização, dependentes de sequências alteradas nos terços centrais das cadeias alfa e beta (23).

O número de disfibrinogénias por mutações genéticas já descritas afecta cerca de 300 famílias actualmente. Existem portanto numerosas moléculas de fibrinogénios anormais já descritas. Deve salientar-se que a história clínica destes doentes revela muitas vezes uma tendência trombótica, mas também em alguns casos existe uma tendência hemorrágica. Alguns casos são também assintomáticos, não tendo qualquer expressão clínica. Daqui resulta que se torna importante referenciar para estudo aprofundado qualquer alteração detectada nos testes laboratoriais de rotina.

Na realidade deve incentivar-se a predisposição para recolha de dados relativos a estes casos. A sub-valorização destes aspectos pode levar a atrasos na sua identificação. De facto, torna-se cada vez mais evidente que as alterações moleculares do fibrinogénio podem ser responsáveis por uma tendência trombótica, que até há bem pouco tempo não era valorizada.

Bibliografia

- 1 - Carvalho de Sousa, J.: Hemostase e Trombose. Ed. J. Carvalho de Sousa. 1993. Lisboa
- 2 - Greenberg, C. S.: Fibrin formation and stabilization. In: Thrombosis and Hemorrhage. Loscalzo, J.; Schafer, A. I. Ed. Blackwell S. P. 1994. London. pp 107-126
- 3 - Ouimet, H.; Loscalzo, J.: Fibrinolysis. In: Thrombosis and Hemorrhage. Loscalzo, J.; Schafer, A. I. Ed. Blackwell S. P. 1994. London. pp 127-143
- 4 - Mosesson, M. W.; Amrani, D. L.; Siebenlist, K. R.; Diorio, J. P.: Fibrinogen III. Excerpta Medica. Elsevier. Amsterdam. 1988
- 5 - Chung, D. W.; Davie, E. W.: Gama and Gama α chains of human Fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry*. 1984; 23: 4232-36
- 6 - Farrell, D. H.; Thiagara, J. P.; Chung, D. W.; Davie, E. W.: Role of fibrinogen alpha and gamma chains sites in platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89: 10729-10732
- 7 - Nickerson, J. M.; Fuller, G. M.: Modification of fibrinogen chains during synthesis. Glycosylation of b-beta and gamma chains. *Biochemistry*. 1981; 20: 2818-2821
- 8 - Hettasch, J. M.; Bolyard, M. G. Lord, S. T.: The residues AGDV of recombinant gamma chains of human fibrinogen must be carboxy terminal to support platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 1992; 68: 701-706
- 9 - Yamazumi, K.; Doolittle, R. F.: Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: localization of the label to gamma chain Tyr-363. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 89: 2893-2896
- 10 - Binnie, C. G.; Hettasch, J. M.; Strickland, E.; Lord, S. T.: Characterization of human purified recombinant fibrinogen: partial phosphorylation of fibrinopeptide A. *Biochemistry*. 1993; 32: 107-113
- 11 - Koopman, J.; Haverkate, F.; Lord, S. T.; Grimberg, J.; Mannucci, P. M.: Molecular basis of fibrinogen Naples associated with defective thrombin binding and thrombophilia. Homozygous substitution of Bbeta 68 Ala-Thr. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 238-244
- 12 - Kaczmarek, E.; Lee, M. H.; McDonagh, J.: Initial interaction between fibrin and tissue plasminogen activator. The Gly-Pro-Arg-Pro binding site on fibrin(ogen) is important for t-PA activity. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 2474-2479.
- 13 - Lorand, L.; Losowsky, M. S.; Milozewsky, K. J.: Human Factor XIII: fibrin stabilization factor. *Prog. Hemost. Thromb.* 1980; 5: 245-290.
- 14 - Henschen, A. H.: Human Fibrinogen. Structural variants and functional sites. *Thromb. Haemost.* 1993; 70 (1): 42-47.
- 15 - Ebert, R. F.: Index of variant human fibrinogens. CRC Press, Boca Raton. 1991; pp: 1-5.
- 16 - Muller, E.; Henschen, A.: Isolation and characterization of human plasma fibrinogen molecular size variants by high performance liquid chromatography and amino acid sequence analysis by high performance liquid chromatography and amino acid sequence analysis. In: Henschen, A. H.: Human Fibrinogen. Structural variants and functional sites. *Thromb. Haemost.* 1993; 70 (1): 42-47.
- 17 - Hornyak, T. J.; Schafer, J. A.: Interaction of Factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry*. 1992; 31: 423-429.
- 18 - Siebenlist, K. R.; Mosesson, M. W.: Factors affecting gamma-chain multimer formation in cross linked fibrin. *Biochemistry*. 1992; 31: 936-941.
- 19 - Henschen, A. H.; Baumann, R.: Identification of polymorphic sites in the human fibrinogen chains using the polymerase chain reaction. *Thromb. Haemost.* 1991; 65: 901.
- 20 - Baumann, R. E.; Henschen, A. H.: Linkage desequilibrium between human fibrinogen DNA polymorphisms associated with the Bbeta chain gene at the HAE III and Bbeta sites. *Thromb. Haemost.* 1993; 69: (Abs.).
- 21 - Baumann, R. E.; Henschen, A. H.: "Genetic variation at the human Bbeta fibrinogen influences formation of a specific DNA protein complex with the interleukin 6 response element." *Thromb. Haemost.* 1993; 69: (Abs.).
- 22 - Bara, L.; Nicaud, L.; Tiret, F.; Cambiém, M.; Samama, M.: "Expression of a paternal history of premature myocardial infarction of fibrinogen, factor VIIc, and PAI-1 in European offspring. The EARS Study". *Thromb. Haemost.* 1994; 71: 434-440.
- 23 - Loskutoff, D. J.; Curriden, S. A.: "The fibrinolytic system on the vessel wall and its role in the control of thrombosis". - *Ann. Acad. Sci.* 1990; 598: 238-247.
- 24 - Palmeiro A.; Carvalho de Sousa J.; Ferrer Antunes C.: "Polimorphism of the Beta Fibrinogen gene in a hospital population." - *Thromb. Haemost.* 1994 (For publishing).