

# Nuevo rol para una vieja proteína: fibrinógeno

Baez MC<sup>1,2</sup>, Tarán M<sup>1</sup>, Culasso JM<sup>1,3</sup>, Balceda A<sup>1,4</sup>,  
Scribano MP<sup>1</sup>, Moya M<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas,  
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup>IICSHUM, Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina.

<sup>3</sup>Hospital Materno Provincial Federico Luchinni, Córdoba, Argentina.

<sup>4</sup>Cátedra de Física Biomédica, Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina.

Correo electrónico: monicamoya@hotmail.com, baezmdc@yahoo.com.ar

Trabajo premiado con Mención Especial en el  
X Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis

Fecha de recepción: 27/11/2012  
Fecha de aprobación: 28/02/2013

HEMATOLOGIA, Vol. 17 N° 1: 21-25  
Enero-Abril, 2013



ARTÍCULO  
ORIGINAL

## RESUMEN

En la actualidad se considera que la hiperfibrinogenemia (HF) refleja el fenómeno inflamatorio y prooxidativo que acompaña a la aterosclerosis subclínica, mediado por citoquinas, LDL-oxidadas y radicales libres de oxígeno. Se analizó en un modelo experimental de aterogénesis inducido por HF las probables lesiones a nivel endotelial y sobre la morfología mitocondrial. Se utilizaron ratas: A) Control, B) HFx30ds y C) HFx60ds. HF se indujo por inyección subcutánea de adrenalina (0.1 ml/rata/día) y se estudió por espectrofotometría las concentraciones del mismo. Se analizó histopatología por microscopía óptica (MO) y morfología mitocondrial por microscopía electrónica (ME). Estadística: ANOVA y Chi-Cuadrado, nivel de significación  $p < 0.05$ . En los grupos (B) y (C) el fibrinógeno aumentó su concentración plasmática comparados con (A) ( $p < 0.001$ ). La MO del grupo (B) mostró 81.66% de denudación endotelial y 88.88% engrosamiento intimal, en (C) 95% presentó denudación y 99% engrosamiento intimal ( $p < 0.01$  para ambos grupos). El número total y medio de mitocondrias disminuyó en (B) y (C), además se observaron disminución de las crestas, aumento de la matriz intermembranosa y tumefacción turbia respecto al control ( $p < 0.01$ ). La HF persistente generaría la progresión de las lesiones a nivel endotelial provocando cambios en su estructura e impactaría directamente a nivel mitocondrial perpetuando el proceso aterogénico.

**Palabras claves:** Fibrinógeno, Aterogénesis, Disfunción endotelial, Mitocondria

## ABSTRACT

Hiperfibrinogenemia (HF) was considered that reflects the inflammatory and prooxidative process associated at

subclinical atherosclerosis mediated by cytokines, oxidized LDL and oxygen free radicals. We studied in an experimental model of atherogenesis induced by HF the probable lesions on endothelial level and the mitochondrial morphology. Three groups of male rats were used: A) Control, B) HFx30ds and C) HFx60ds. HF was induced by subcutaneous injection of adrenaline (0.1 ml/rat/day) and its concentration was studied by spectrophotometry. Histopathology was analyzed by optical microscopy (OM) and mitochondrial morphology by electron microscopy (EM). Statistics: ANOVA and Chi-square, significance level  $p < 0.05$ . In groups (B) and (C) plasma fibrinogen concentration increased compared with (A) ( $p < 0.001$ ). The MO group (B) showed 81.66% to 88.88% endothelial denudation and intimal thickening in (C), 95% presented denudation and 99% intimal thickening ( $p < 0.01$  for both groups). In groups (B) and (C) the total, mean number and mitochondrial crests reduced significantly, the intermembranous matrix increased and swelling was observed with respect to (A) ( $p < 0.01$ ). Persistent HF would generate the progression of lesions to endothelial level causing changes in its structure and would impact directly at the mitochondrial morphology perpetuating the atherogenic process.

**Key words:** Fibrinogen, atherogenesis, endothelial dysfunction, mitochondria

## INTRODUCCIÓN

Las complicaciones isquémicas desencadenadas por la aterosclerosis siguen siendo la principal causa de morbimortalidad a nivel mundial y en nuestro país<sup>1,2,3</sup>. La evolución del conocimiento fisiopatológico

co de aterogénesis, ha conferido al componente inflamatorio y prooxidativo una importancia equivalente a la acumulación de lípidos en la pared vascular. Este proceso origina radicales libres y productos específicos sintetizados como vía final común de factores de riesgo cardiovasculares (FRC)<sup>4,5</sup>. La hiperfibrinogenemia (HF), considerada como un factor de riesgo emergente e independiente para aquellos pacientes con FRC clásicos controlados y que padecen eventos cardiovasculares agudos<sup>6,7</sup>. La HF afecta el delicado equilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores<sup>8,9</sup> generando disfunción endotelial, uno de los eventos primarios en aterogénesis. El endotelio activado por HF y mediado por citoquinas del tipo TNF- $\alpha$ <sup>10</sup> secreta intermediarios reactivos del oxígeno especialmente óxido nítrico (NO) cuya función es modular el tono vascular, se sintetiza en el interior de la célula endotelial y en la matriz mitocondrial de las células musculares lisas<sup>11</sup>. Cuando incrementa el estrés oxidativo por estímulos proaterogénicos, como sería la HF, la molécula de NO podría modificar su síntesis y seguir una vía fisiopatológica transformándose en peroxinitritos al reaccionar con el anión superóxido, induciendo a nivel del músculo liso vascular alteraciones morfológicas mitocondriales, último blanco del estrés oxidativo reproduciendo la lesión isquémica patonogmónica de la aterosclerosis<sup>12,13</sup>.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar en un modelo experimental inducido por HF alteraciones compatibles con aterogénesis a nivel de la pared vascular aórtica y su probable repercusión en la morfología mitocondrial de células musculares lisas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ratas macho (280  $\pm$  20g.), cepa Wistar endocriadas en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). La investigación fue aprobada por la Comisión de Ética de la FCM de la UNC. Los grupos se dividieron en: **Grupo A:** control (sin inducción de HF); **Grupo B:** HF por 30 días.; **Grupo C:** HF por 60 días. La inducción de HF se realizó por inyección subcutánea de adrenalina (0.1ml/día/rata)<sup>14,15</sup>, la sangre se obtuvo a las 72 horas de la última inducción de HF, en coincidencia con los 30 y 60 días. Se realizaron 30 secciones de 4  $\mu$ m cada corte por cada animal. El material se conservó en formol al 10%, coloreados con hematoxilina-eosina (HE) y analizados por MO. Para ME se obtuvieron cortes "in toto" de 2 mm de aorta torácica en todos los lotes estudiados<sup>16</sup>, luego se fotografiaron por ME (Leo 906E). Las concentraciones de fibrinógeno plasmático

(mg/dL) se determinó por espectrofotometría según Ratnoff y Menzie<sup>17</sup>.

## Análisis estadístico

HF se analizó con ANOVA y test post hoc Hotelling. Chi-Cuadrado para estudiar las lesiones anatómicas. La cuantificación mitocondrial se midió con Axiovisión 4.8 y Chi-Cuadrado. Se estableció un nivel de significación de  $p < 0.05$  para todos los casos.

## RESULTADOS

En los grupos (B)(266  $\pm$  13) y (C)(359  $\pm$  9) el fibrinógeno aumentó significativamente comparados con el grupo (A) (191  $\pm$  22) ( $p < 0.001$  para ambos grupos) (Tabla 1). Cuando se estudiaron los 300 cortes por MO de aorta torácica en el grupo (B) (Fig. 1), el 81.66% presentaron múltiples sectores de denudación endotelial con hematias adheridos y un 88.88% mostró engrosamiento intimal respecto al grupo (A) (Fig. 2) ( $p < 0.001$ ). El grupo (C) (Fig. 3) evidenció denudación endotelial en un 95% y el 99% presentó engrosa-

TABLA 1.- Concentraciones de fibrinógeno plasmático en ratas con aterogénesis inducida por HF (n=12)

|                     | Control (A)    | HF x 30 ds. (B) | HF x 60 ds. (C) |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Fibrinógeno (mg/dL) | 191 $\pm$ 22 * | 266 $\pm$ 13 *  | 359 $\pm$ 9 *   |

\* ( $p < 0.001$ )

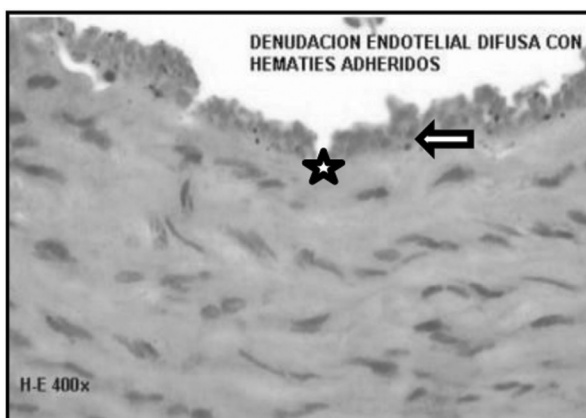


Fig. 1.- Corte histológico de aorta torácica correspondiente al lote con HF x 30 días (B) donde se observa denudación endotelial difusa con hematias adheridos (flecha) y engrosamiento de la íntima (estrella) (HE-400X).

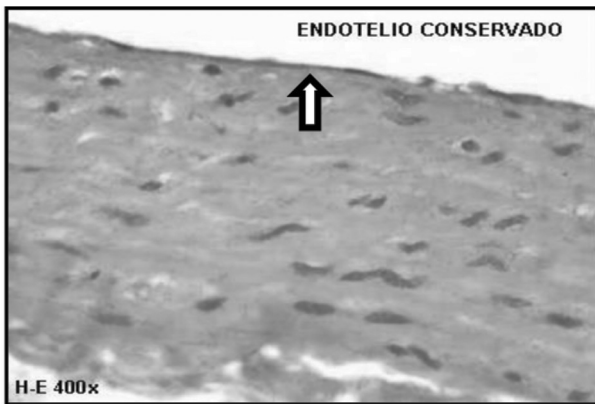


Fig. 2.-Corte histológico de aorta torácica correspondiente al lote control (A) donde se observa endotelio y adventicia indemnes (flecha) (HE-400x).

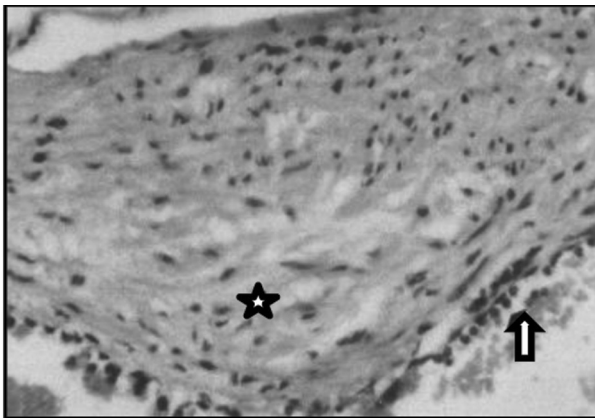


Fig. 3.- Corte histológico de aorta torácica correspondiente al lote con HF x 60 días (C) se observa protusión roma hacia la luz vascular, focos de denudación endotelial (flecha), engrosamiento de la íntima y aumento de la matriz extracelular (estrella) (HE-40x).

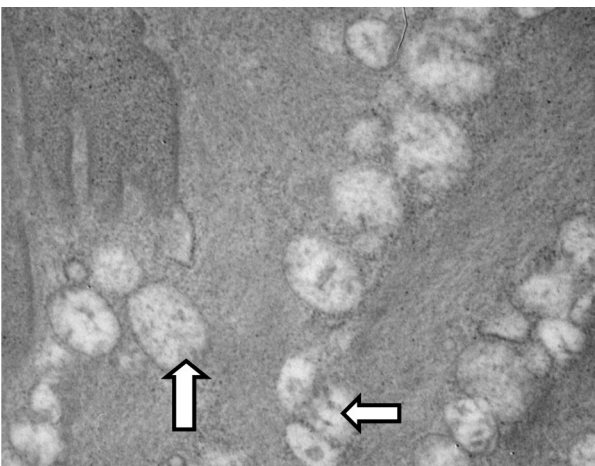


Fig. 4.- ME del grupo (B) se observan mitocondrias con un aumento de tamaño, dilatación del espacio intermembranoso y desorganización de crestas con presencia de gránulos electrodensos (flechas).

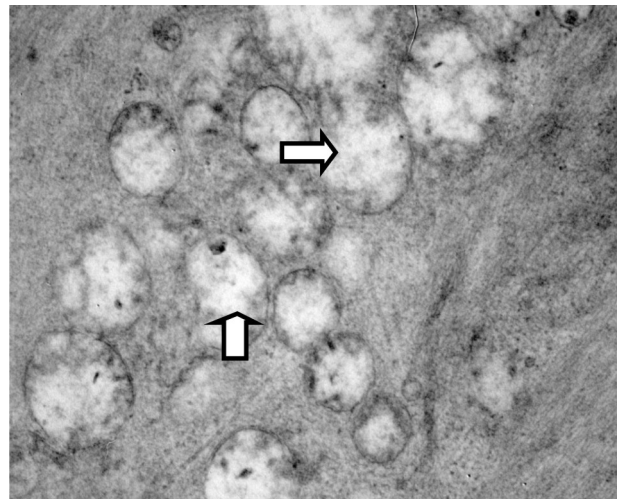


Fig. 5.- La ME del grupo (C) muestra tumefacción, aclaración de la matriz con vacuolas y sin crestas y gránulos electrodensos, tanto en membranas como en crestas (flechas).

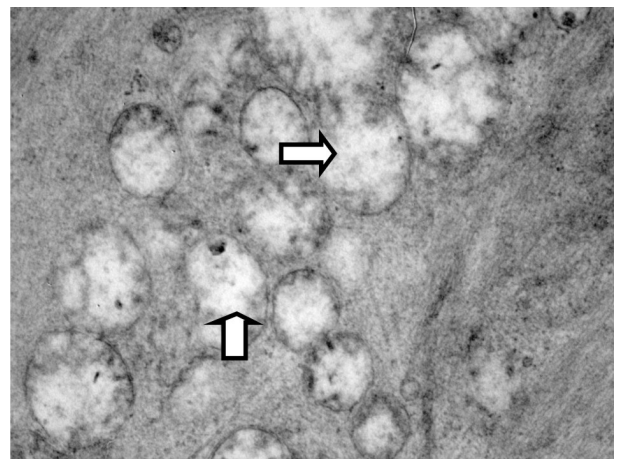


Fig. 6.- La ME del grupo (A) muestra mitocondrias de forma y tamaño normal (flecha).

miento intimal y aumento de la matriz extracelular respecto al control (A) ( $p < 0.001$ ). Las alteraciones morfológicas por ME mostraron que el número total y medio de mitocondrias disminuyó significativamente en los grupos (B) (Fig. 4) y (C) (Fig. 5) respecto al control (A) (Fig. 6) ( $p < 0.01$ ). Además (B) y (C) presentaron aumento de tamaño y aclaramiento de matriz mitocondrial con vacuolas y crestas desorganizadas, cambios denominados tumefacción mitocondrial. Cuando se realizó la cuantificación mitocondrial se comprobó que (C) presentó una mayor proporción de alteraciones de grado 3 comparado con el grupo (B) ( $p < 0.001$ ) (Tabla 2).

TABLA 2.- Mediciones mitocondriales en el músculo liso de aorta torácica en ratas con aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia (n=12)

| Mediciones                     | Control (A)                                     | HF x 30 ds (B)                                 | HF x 60 ds (C)                                     |
|--------------------------------|---|--|--|
| Número total de mitocondrias*  | 54  | 24   | 35   |
| Número medio de mitocondrias*  | 9 ± 0.30  | 3 ± 1.45                                       | 6 ± 1.66   |
| Área media de las mitocondrias | 465.61 ± 28.06 $\mu\text{m}^2$                  | 528.50 ± 81.73 $\mu\text{m}^2$                 | 636.29 ± 55.64 $\mu\text{m}^2$                     |
| Grado de alteración            | 87.25 % grado 1<br>12.75% grado 2<br>0% grado 3 | 0% grado 1<br>79.28% grado 2<br>20.72% grado 3 | 8.571% grado 1<br>43.92% grado 2<br>47.50% grado 3 |

\* Área total medida 1986  $\mu\text{m}^2$

## DISCUSIÓN

La HF inducida experimentalmente con adrenalina sintética incrementó utilizando la vía extraadrenal, generando un proceso de down-regulation con respecto a la adrenalina endógena, este incremento del fibrinógeno podría ser el resultado de la síntesis y secreción hepática a demanda como respuesta a la inducción proinflamatoria<sup>14</sup>. La HF observada en nuestros resultados demostró que a medida que persiste en el tiempo, el grado de extensión y acentuación de las lesiones se intensifica, reflejando el proceso epiinflamatorio de la fase subclínica de aterogénesis<sup>18,19</sup>. Asociado a la persistencia de HF se evidenció denudación endotelial quedando el colágeno subyacente expuesto facilitando la agregación plaquetaria reflejando disfunción endotelial y la actividad inflamatoria focal presente en la aterogénesis. Además, la HF generó engrosamiento intimal por estímulos fisiológicos que constituyen un intento del tejido para mantener condiciones normales de flujo, geometría arterial y resistencia al flujo en los segmentos vasculares dañados. El aumento en la matriz extracelular, los cambios mixoides subendoteliales y la protrusión de la pared vascular hacia la luz se corresponden con lesiones aterogénicas tipo I, II y III según la clasificación de Stary modificada por Fuster<sup>20,15</sup>. Los daños en la morfología mitocondrial observado en los grupos con HF se debería al influjo y condensación del ión  $\text{Ca}^+$  que generaría depósitos de sales insolubles como consecuencia de lipoperoxidación en la membrana mitocondrial inducida por las especies reactivas de oxígeno, generando un aumento en la concentración de calcio intracelular debido principalmente a su liberación de receptáculos endógenos como el retículo sarcoplásmico<sup>21</sup>. Estas modificaciones mitocondriales se relacionan con los cambios anatomopatológicos a nivel aórtico con aumento de permeabilidad de membranas celulares y subcelulares generadas por estrés oxidativo inducido por HF<sup>22</sup>. Estos resultados demos-

trarían que la HF persistente generaría progresión de lesiones a nivel endotelial provocando cambios en su estructura e impactaría directamente a nivel mitocondrial perpetuando el proceso aterogénico.

Los autores de este trabajo declaran al mismo no afectado por conflictos de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

- García-Moll X. Inflamación, aterosclerosis, factores de riesgo clásicos, bioestadística, significación clínica. ¿Dónde estamos? *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 1220-1222.
- Calandrelli M, Saavedra M, Trevisán M, y col. Relevamiento de factores de riesgo cardiovascular en Bariloche. *Rev Arg Cardiol* 2011; 79: 344-350.
- Sanz G, Fuster V. Prevención de las enfermedades cardiovasculares: un reto sin resolver. *Rev Fed Arg Cardiol* 2010; 39 (3): 157-162.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138 (5): 419-420.
- Hansson G.K, Robertson A.K, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 297-329.
- Práctico D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* 2005; 181: 215-224.
- Guo F, Liu J, Wang C, Liu N, Lu P. Fibrinogen, fibrin, and FDP induce C-reactive protein generation in rat vascular smooth muscle cells: pro-inflammatory effect on atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(3): 942-6.
- Fernández Travieso J.C. El fibrinógeno como factor de riesgo de enfermedad aterotrombótica. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 2009; 40 (1): 3-12.
- Delgado Roche L, Martínez S. G. y Díaz B. A. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (3): 307-13.
- Moya M, Campana V, Gavotto A, Spitale L, Simes J, Palma J. Hyperfibrinogenemia in rats treated with meloxicam Japan H J 2002; 43(5): 559-566.
- Kwang KK, Pyung CO and Michael JQ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Research* 2009; 81: 649-659.
- Davidson SM. Endothelial mitochondria and heart disease. *Cardiovasc Res.* 2010; 88 (1): 58-66.
- Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch.* 2010; 459(6): 923-39.

14. Palma JA, Enders J, de Oliva PP. Effects of epinephrine on plasma fibrinogen levels in rats submitted to tissue injury. **Experientia** 1981; 7(7): 780-2.
15. Baez M. C, Táran M. D., Campana V., Simes J. C, Pons P, Moya M. Marcadores de estrés oxidativo en aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia. **Arch Cardiol Méx** 2009; 79 (2): 85-90.
16. Karnovsky MJ, Graham RC. A Formaldehyde- glutaraldehyde fixative of high osmolarity by MET. **J Cell Biol** 1965; 27: 137-138.
17. Ratnoff OD, Menzie AC. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. **J Lab Clin Med** 1957; 37: 316-20.
18. Best L, North K, Li X, Palmieri V, Umans J & col. Linkage study of fibrinogen levels: the Strong Heart Family Study. **BMC Medical Genetics** 2008; 9: 77.
19. Fragoso JM; Ramírez J; Cruz D; Pérez O; de la Peña A; Vargas G. Marcadores pro y antiinflamatorios en la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo. **Arch Cardiol Mex** 2009; 79 (01): 54-62.
20. Fuster V, Fayard ZA, et al. Acute coronary syndrome: biology. **Lancet** 1999; 353: 5-9.
21. García-Rivas GJ. Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección. **REB.** 2006; 25 (1): 20-25.
22. Harrison CM, Pompilius M, Pinkerton KE, Ballinger SW. Mitochondrial Oxidative Stress Significantly Influences Atherogenic Risk and Cytokine Induced Oxidant Produc **Environ Health Perspect** 2010; 119 (5): 676-681.

**Agradecimientos:** Este trabajo se realizó con subsidios de SECYT, UNC (2011) y CICYT, UNLaR (2012)