

# Alteraciones de la fibrinoformación en la cirrosis hepática

J. FERNANDEZ, M.J. NARVAIZA, B. CUESTA, J.A. PARAMO, A. LOPEZ FERNANDEZ,  
R. FEBRES, E. ROCHA

SANGRE, 27 (4-B) 705-726, 1982.

Fernández, J.; Narvaiza, M.J.; Cuesta, B.; Páramo, J.A.; López Fernández, A.; Febres, R.; Rocha, E.  
ALTERACIONES DE LA FIBRINOFORMACION EN LA CIRROSIS HEPATICA (*Fibrinoformation  
impairment in cirrhosis of the liver*).

*Fibrinoformation impairment was assessed in 30 patients with cirrhosis of the liver and in 10 normal newborns. The results attained were compared to those of 30 healthy subjects. Thrombin and reptilase times were significantly prolonged in 14 of the patients, who showed impaired fibrin monomers polymerization as well. Two patients had increased fibrin degradation products, and three showed high levels of gammaglobulin, which could explain their fibrinoformation abnormalities.*

*The remaining 9 patients had abnormalities accounting for acquired dysfibrinogenaemia. Their fibrinogen molecule showed increased sialic acid concentration, and after this was removed the previously altered thrombin time returned to normal. Other anomalies found affected the following functions: Fibrinopeptide release, in 1 case; fibrin stabilization, in 4 cases; fibrinogen digestion by plasmin, in 5 cases; fibrinogen electrophoretic mobility in one case, and the high to low molecular weight fractions ratio, in one case. Antigenic identity, molecular weight, isoelectric point, sedimentation coefficient, and aminoacid assay were normal in all the patients.*

*The 10 newborn infants had prolonged thrombin and reptilase times plus anomalous fibrin monomer polymerization. Purified fibrinogen showed in all cases increased sialic acid content, and its removal brought about the thrombin time normalization.*

*It was concluded that acquired dysfibrinogenaemia is frequent in the course of cirrhosis of the liver and such alteration resembles that found in the newborn's plasma; so this fact would support the hypothesis that the cirrhotic liver may show some regression to the synthesis of foetal fibrinogen.*

Reprints: Dr. E. Rocha, Seminario de Hematología. Depto. Medicina Interna, Clínica Universitaria. Universidad de Navarra, Pamplona.

## INTRODUCCION

El fibrinógeno es una proteína sintetizada principalmente por el hígado, como ha podido demostrarse mediante técnicas inmunoquímicas y de inmunofluorescencia y por métodos de perfusión (6, 15, 38, 74).

Desde un punto de vista estructural es un dímero con dos subunidades idénticas constando cada una de ellas de tres cadenas polipeptídicas llamadas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$ . Ambas subunidades, así como dichas cadenas, se encuentran unidas entre sí por enlaces disulfuro.

Presenta una fracción glucídica compuesta por moléculas de ácido siálico, en posición terminal, seguida por D-galactosa, N-acetilglucosamina y D-manosa. Su síntesis se realiza en el hepatocito donde al precursor protéico de la glicoproteína se van incorporando los diferentes carbohidratos mediante sus correspondientes glicosiltransferasas (74).

En las enfermedades hepatocelulares severas se ha descrito con frecuencia la existencia de un alargamiento del tiempo de trombina, atribuyéndose dicha alteración a tres posibles causas: disminución de la concentración del fibrinógeno circulante, presencia de inhibidores plasmáticos o existencia de una anomalía molecular del fibrinógeno.

*Servicio de Hematología. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.*

En el primer caso se considera que esta situación pueda ser debida a una disminución de su síntesis (9), o, más frecuentemente, a una hiperfibrinólisis primaria (37, 72), o a un cuadro de defibrinación secundario o a una coagulación intravascular diseminada (9, 17, 18, 65), a veces acompañada de una hiperfibrinólisis secundaria (33).

En otros casos la alteración existe con cifras normales de fibrinógeno por lo que se ha sugerido como causa un aumento de la actividad antitrombínica del plasma secundaria a un incremento de productos de degradación del fibrinógeno/fibrina (PDF) como consecuencia de diversos mecanismos (9, 70).

Por último se considera la existencia de una disfibrinogenemia adquirida, entidad mencionada por primera vez por Ratnoff en 1954 (67) y posteriormente por Soria y colab. (75) que describieron una alteración del tiempo de trombina y de la polimerización de monómeros de fibrina en un paciente con hepatitis crónica activa. Desde entonces han sido observadas alteraciones funcionales del fibrinógeno en gran número de pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica activa (1, 16, 28, 29, 39, 40, 44, 59, 62, 69, 75, 79), así como en carcinomas hepatocelulares (2, 5, 7, 19, 26, 27, 82). En todos ellos existe en común un alargamiento de los tiempos de trombina y reptilase, así como un retraso en la polimerización de los monómeros de fibrina.

Para explicar este último hecho se han esgrimido diversas teorías:

1.— Acción inhibitoria de proteínas plasmáticas: Lane y colab. (40) y Palascak y Martínez (62) creen posible que el fibrinógeno sintetizado por el hígado sea normal, sufriendo una alteración funcional en el plasma como consecuencia de las anomalías proteicas secundarias al proceso hepático.

2.— Síntesis alterada del fibrinógeno: dentro de esta hipótesis existen dos teorías diferentes:

a) Aumento de la fracción de bajo peso molecular: Lipinski y colab. (44) objetivaron un aumento de la fracción de bajo peso molecular con menor capacidad coagulable, lo que explicaría el alargamiento de los tiempos coagulativos que miden la fibrinoformación. Este hecho sería secundario a la degradación catabólica de la fracción de mayor peso molecular de un fibrinógeno anómalo, lo que fue confirmado por Brodsky y colab. (11) que observaron una disminución de la vida media del fibrinógeno en enfermos con procesos crónicos hepáticos.

b) Alteración de la fracción glucídica: el dato que con mayor frecuencia ha sido observado en los diferentes estudios sobre la disfibrinogenemia de los enfermos hepáticos es una alteración a nivel de la fracción glucídica, consistente en un aumento del contenido de ácido siálico con incremento de la relación ácido siálico/hemoxinas (1, 23, 47, 48, 49, 53, 64, 55, 61, 73, 79). Esta mayor concentración de ácido siálico provocaría un aumento de cargas negativas, lo que daría lugar a la aparición de fuerzas repulsivas entre los monómeros de fibrina, y por tanto a un enlentecimiento de su polimerización; consecuentemente se produciría un alargamiento de los tiempos de trombina y reptilase (27). Esta hipótesis ha sido confirmada mediante la observación de que el tiempo de trombina realizado con fibrinógeno purificado de estos pacientes, inicialmente patológico, se normalizaba una vez era desializado dicho fibrinógeno (27, 46, 47, 48, 61).

3.— Regresión a la síntesis de un fibrinógeno fetal: Barr y colab. (8) sugirieron la regresión del hepatocito a la síntesis de un fibrinógeno fetal por los nódulos de neoformación hepática en las cirrosis, o el tejido neoplásico de los hepatomas.

4.— Síntesis de fibrinógeno fetal con aumento de la fracción glucídica: Gralnick y colab. (27) propusieron una nueva hipótesis que unifica las dos anteriormente citadas. El fibrinógeno, sintetizado por el tejido hepático neoformado, presentaría un aumento de ácido siálico, pero ello sería debido a que los hepatocitos inmaduros producirían un fibrinógeno fetal, lo que lleva a pensar que existe una identidad entre la variante molecular del fibrinógeno fetal y la que aparece en cirrosis hepática y carcinomas hepatocelulares. Estos datos serían similares a los obtenidos, en pacientes con hepatomas, de variantes de fosfatasa alcalinasa y vitamina B<sub>12</sub>, que presentan aumento de ácido siálico, mayor carga negativa y migración electroforética anódica, lo que les hace semejantes a las

formas fetales correspondientes (12, 32, 83, 84). Así mismo han sido halladas proteínas fetales en tejidos regenerativos no neoplásicos (34).

Nuestro estudio ha sido realizado en un grupo de enfermos cirróticos tratando de conocer la frecuencia de esta alteración, la naturaleza de la misma y el posible mecanismo que la produce.

### MATERIAL

El estudio ha sido realizado en tres tipos de poblaciones diferentes: 30 sujetos normales que integran el grupo control, 10 recién nacidos y 30 enfermos cirróticos, de los cuales en 20 la etiología de su proceso era de tipo alcohólico y en 10 posthepática, todos ellos con confirmación anatomopatológica.

#### *Recogida de muestras*

Para las distintas determinaciones la sangre era recogida por punción venosa en los adultos, y a partir de cordón umbilical en el momento del parto en los recién nacidos, usando material siliconado, sobre citrato trisódico al 3,8 % en proporción 9: 1. El plasma era obtenido mediante centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos a 4°C, siendo conservado en baño de hielo hasta el momento de su uso.

La determinación de PDF en suero se realizó mediante recogida de sangre total en un tubo de vidrio con trombina y ácido epsilon-aminocaproico (EACA), posteriormente se incubaba durante dos horas a 37°C y se centrifugaba 15 minutos a 3.000 g.

#### *Reactivos*

Trombina humana fue obtenida de Boehringer Mannheim. Suero antifibrinógeno y kit para determinación de factor XIII de Behring Institut. Reptilase de Pentapharm Ltd. Agarosa y control de proteínas de peso molecular de Pharmacia Fine Chemicals. Acrilamida N, N', metilbis-acrilamida, persulfato amónico y N, N, N', N', tetrametiletilendiamine de Koch-Light Lab. Ltd.  $\beta$ -mercaptoetanol de Merck. Plasmina de Kabi Diagnóstica. Trasylol de Bayer. Amfolinas ph = 3,5-10 de Lab. LKB. Dodecilsulfato sódico, ácido N-acetil neuramídico, D-galactosamina, D-glucosamina y neuraminidasa purificada tipo 5 de Sigma Chemical Company.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del más alto grado de pureza posible.

### MÉTODOS

#### *1.— Estudio en plasma y suero*

El tiempo de trombina fue determinado según la técnica de Jim (35). Se realizaron, con esta técnica, correcciones del tiempo de trombina a pH 7, 7,8 8,6 y 9,4. El tiempo de reptilase se obtuvo siguiendo la técnica de Straub y Funk (80).

La concentración de fibrinógeno fue medida por cuatro métodos diferentes: de precipitación por el calor según Aznar y colab. (4), colorimétrico según Ratnoff y Menzie (66), inmunológico según Laurell (42) y coagulativo según Clauss (14). La dosificación del factor XIII se realizó por el método de Bohn y Haupt (10). El estudio de la polimerización de los monómeros de fibrina se hizo según la metódica de Gruendlinger y Bouvier (30) utilizando trombina y reptilase como inductores y midiendo los cambios de densidad óptica a 350 nm de longitud de onda. La determinación de PDF por la técnica de Merskey y colab. (52).

#### *2.— Purificación de la molécula de fibrinógeno.*

La molécula de fibrinógeno fue purificada siguiendo una técnica desarrollada en nuestro propio laboratorio (21).

El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, todas las centrifugaciones fueron realizadas a 3.000 g y en todos los pasos se añadió EACA a una concentración final 0,1 M.

La técnica incluía una absorción con  $\text{BaSO}_4$  a una concentración de 100 mgr/c.c. de plasma; la mezcla se agitaba durante una hora y se centrifugaba 15 minutos. El sobrenadante se sometía a una doble precipitación con glicina con una concentración de 165 mgr/c.c. Después de agitar durante 30 minutos la mezcla se centrifugaba durante 15 minutos. El precipitado así obtenido se redisolvió, en un volumen idéntico al del plasma de partida, con tampón citrato-NaCl 0,005 M, pH 7. En estas condiciones la solución se sometía a una doble precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 26 por ciento de saturación; la mezcla se agitaba durante 30 minutos y se centrifugaba por un período de 15 minutos. El precipitado obtenido se redisolvió en 1/4 del volumen inicial con el tampón previamente citado.

La solución así obtenida contenía fibrinógeno a una concentración de  $150 \pm 20$  mgr por ciento, siendo el porcentaje de coagulabilidad de la proteína de  $96 \pm 2$  por ciento.

Una vez obtenido este preparado purificado de fibrinógeno, era distribuido en alícuotas y conservado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su uso.

### 3.— Estudio en fibrinógeno purificado

#### A) Pruebas funcionales

El índice de coagulabilidad fue medido por el método de Narvaiza (60) y la liberación de fibrinopéptidos A y B según la técnica de Soria y colab. (77).

La estabilización de la fibrina fue determinada utilizando la siguiente metódica: en dos tubos de hemólisis se colocaban 0,1 c.c. de la solución de fibrinógeno (150 mgr %) y se añadía a cada uno de ellos 5 NIH de trombina humana y 50  $\mu\text{l}$  de reptilase respectivamente. La mezcla se mantenía a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, pasados los cuales se añadía a cada tubo 0,1 c.c. de la solución de incubación descrita por Weber y Osborn (85) manteniéndose durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaba electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, siguiendo la técnica de Weber y Osborn (85), de cada una de estas mezclas.

#### B) Digestión por plasmina del fibrinógeno y la fibrina

Fueron ambas realizadas siguiendo la metódica descrita por Krause y colab. (36) con algunas modificaciones personales.

En el caso de la digestión del fibrinógeno se colocaban en una serie de tubos de hemólisis 0,1 c.c. de una solución de fibrinógeno purificado (150 mg por ciento) a los que se añadían 2,5 CU de plasmina. A los 2, 5, 15, 30, 60, y 120 minutos se inhibían la lisis plasmínica mediante la adición de 250 U/mgr. de Trasylol. La identificación de los productos de degradación se realizaba por inmunoelectroforesis, según la técnica de Grabar y Williams (25) y por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 7,5 por ciento siguiendo la metódica de Weber y Osborn (85).

Para la digestión de la fibrina se colocaban 0,25 c.c. de una solución de fibrinógeno purificado (150 mg por ciento) en una serie de tubos de hemólisis y a cada uno de los tubos se les añadían 2,5 NIH de trombina humana. La mezcla era incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y al cabo de este tiempo se añadían 5 CU de plasmina a cada uno de los tubos. A los 2, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos se inhibía la acción de la plasmina mediante la adición de 500 U/mgr de Trasylol. La identificación de los productos de degradación se realizaba de forma similar a la descrita para la degradación del fibrinógeno.

#### C) Características fisicoquímicas de la molécula de fibrinógeno.

La movilidad electroforética del fibrinógeno fue determinada utilizando tres técnicas diferentes: inmunoelectroforesis según Grabar y Williams (25), electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 7,5 por ciento según Weber y Osborn (85) y electroforesis bidimensional según Fernández y colab. (20). La identidad antigénica fue estudiada mediante electroforesis bidimensional tandem según el método de Fernández y colab. (20). El peso molecular fue medido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 7,5 por ciento según Weber y Osborn (85), comparando la movilidad electroforética del fibrinógeno con la de una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. El punto isoelectrico se realizó por la técnica de Sucharib y colab. (81). La determinación del coeficiente de sedimentación

fue realizada en una ultracentrífuga Beckman, modelo L5-65, con rotor SW-41 a 280.000x g, durante 23 horas a 4°C, en un gradiente de sacarosa del 2 al 30 por ciento; el coeficiente  $S_{20,w}$  fue calculado según las tablas descritas por McEwen (50). El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en un autoanalizador Hitachi KLA-5 siguiendo la técnica de Murayama y Shuido (57), previa digestión del fibrinógeno con C1H 6 N a 110°C durante 24 horas.

*D) Estudio de las fracciones de alto y bajo peso molecular del fibrinógeno*

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Lipinska y colab. (43).

*E) Estudio de la fracción glucídica de la molécula de fibrinógeno*

El contenido de ácido siálico fue medido por la técnica de Aminoff (3) y el de hexosaminas siguiendo el método de Cessi y Piliago (13).

La desialización de la molécula de fibrinógeno fue realizada siguiendo la metodología descrita por Soria y colab. (76). En el fibrinógeno nativo y desializado se determinó el tiempo de trombina según Jim (35) y se estudió la movilidad electroforética mediante la técnica de inmunoelectroforesis de Grabar y Williams (25).

*4.- Valoración estadística*

Con los resultados obtenidos se han calculado los valores medios y desviaciones standard, realizando una valoración estadística final mediante la aplicación de la "t" de Student.

## RESULTADOS

Los pacientes cirróticos han sido subdivididos en dos grupos A y B, atendiendo a los resultados de los tiempos de trombina y reptilase y de la polimerización de los monómeros de fibrina. Hemos incluido en el grupo A los 16 pacientes que presentaban valores normales en estas pruebas, y en el grupo B a los 14 enfermos con uno o más parámetros alterados.

*1.- Estudios realizados en plasma y suero*

Los resultados se recogen en los cuadros I, II y III.

Los tiempos de trombina y reptilase eran normales en los enfermos cirróticos del grupo A, mientras que estaban alterados, con diferencias significativas ( $p < 0,001$ ), en los enfermos del grupo B y en el plasma de recién nacidos.

La concentración plasmática de fibrinógeno era normal en los sujetos del grupo A con cualquiera de las cuatro técnicas empleadas. En los enfermos del grupo B era así mismo normal cuando se empleaba una técnica colorimétrica, pero la concentración estaba aumentada ( $p < 0,05$ ) al emplear técnicas que miden la proteína como tal, mientras que la utilización de la técnica coagulativa, que valora la proteína desde un punto de vista funcional, demostraba una disminución de la concentración de fibrinógeno por el método coagulativo ( $p < 0,01$ ) siendo normal con las otras técnicas empleadas.

La dosificación de factor XIII fue normal en todos los sujetos estudiados. Así mismo fueron normales los valores de PDI séricos en todos los casos excepto en dos de los enfermos cirróticos del grupo B que presentaron cifras superiores a 10  $\mu\text{gr/ml}$ .

La realización de tiempos de trombina a Ph diferentes demostró, como puede observarse en la figura 1, la existencia de un claro alargamiento de los valores al alcalinizar el plasma en los enfermos del grupo B y en los recién nacidos respecto al grupo control con

CUADRO I  
ESTUDIOS REALIZADOS EN PLASMA Y SUERO

	Unidad de medida	Grupo control		Enfermos cirróticos				Grupo recién nacidos	
				Grupo A		Grupo B			
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
Tiempo de trombina . . . . .	seg.	17,43	1,59	18,06	1,39	25,36	4,13	23,80	1,62
Tiempo de reptilase. . . . .	seg.	16,23	2,18	17,13	1,78	26,43	3,76	23,50	2,68
Método de precipitación por calor . . . . .	mgr %	219,30	47,47	225,00	38,82	270,36	76,90	226,60	44,47
Método colorimétrico . . . . .	mgr %	232,43	61,66	258,81	64,34	223,29	93,24	225,70	28,10
Método coagulativo. . . . .	mgr %	309,43	84,09	281,25	65,23	230,50	98,01	213,00	28,69
Método inmunológico . . . . .	mgr %	242,20	20,15	256,75	53,85	282,14	63,63	225,50	28,68
Factor XIII . . . . .	%	93,00	16,22	95,00	18,62	87,14	23,67	90,00	11,55
PDF séricos . . . . .	$\mu$ gr/ml	1,64	1,59	1,59	1,54	6,18	7,07	1,18	0,74

Fibrinógeno

CUADRO II  
MODIFICACIONES DEL TIEMPO DE TROMBINA AL ALCALINIZAR EL PLASMA

Tiempo de trombina a (seg.)	Grupo control		Enfermos cirróticos				Grupo recién nacidos	
			Grupo A		Grupo B			
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
pH = 7,0 . . . . .	12,75	0,60	13,30	0,82	16,09	2,07	14,20	1,75
pH = 7,8 . . . . .	15,25	0,54	15,90	1,13	20,91	3,11	28,30	2,95
pH = 8,6 . . . . .	18,35	1,04	20,40	1,71	28,09	6,98	39,40	1,65
pH = 9,4 . . . . .	21,35	1,14	23,65	1,73	37,82	10,03	50,51	9,23

CUADRO III  
POLIMERIZACIÓN DE LOS MONOMEROS DE FIBRINA

Agente inductor	Parámetro	Unidad de medida	Grupo control		Enfermos cirróticos				Grupo recién nacidos	
			$\bar{X}$	S	Grupo A		Grupo B		$\bar{X}$	S
					$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S		
Trombina	Tiempo de latencia.	mm.	6,18	1,31	5,94	0,77	6,25	0,85	8,60	0,81
	Agregación . . . . .	mm.	44,33	6,11	43,44	6,16	23,79	7,57	21,40	2,63
Reptilase	Tiempo de latencia .	mm.	6,25	1,71	6,94	1,39	10,43	3,61	9,40	0,77
	Agregación . . . . .	mm.	42,66	3,20	42,81	6,65	18,07	8,62	16,90	2,51

CUADRO IV  
LIBERACION DE FIBRINOPEPTIDOS A Y B

Tiempo de incubación	Unidad de medida	Grupo control		Enfermos cirróticos				Grupo recién nacidos	
		$\bar{X}$	S	Grupo A		Grupo B		$\bar{X}$	S
				$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S		
2 minutos. . . . .	mgr %	24,55	9,26	23,00	4,46	20,43	3,13	22,80	1,92
5 minutos. . . . .	mgr %	30,22	8,64	29,75	4,14	28,71	4,60	31,60	2,07
10 minutos. . . . .	mgr %	35,33	7,38	37,38	5,03	38,64	9,87	38,20	1,79
20 minutos. . . . .	mgr %	41,00	10,79	44,31	6,32	46,71	10,71	41,60	1,52

CUADRO V  
ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN GLUCIDICA

Parámetro	Unidad de medida	Enfermos cirróticos						Grupo recién nacidos	
		Grupo control		Grupo A		Grupo B		$\bar{X}$	S
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S		
Acido siálico. . . . .	$\mu\text{gr}/\text{mgr}$	0,038	0,006	0,037	0,001	0,047	0,019	0,061	0,006
Hexosaminas. . . . .	$\mu\text{gr}/\text{mgr}$	0,028	0,003	0,027	0,001	0,025	0,004	0,027	0,001
Relación ácido siálico/ hexosaminas. . . . .	—	1,360	0,060	1,360	0,040	2,100	1,200	2,260	0,190

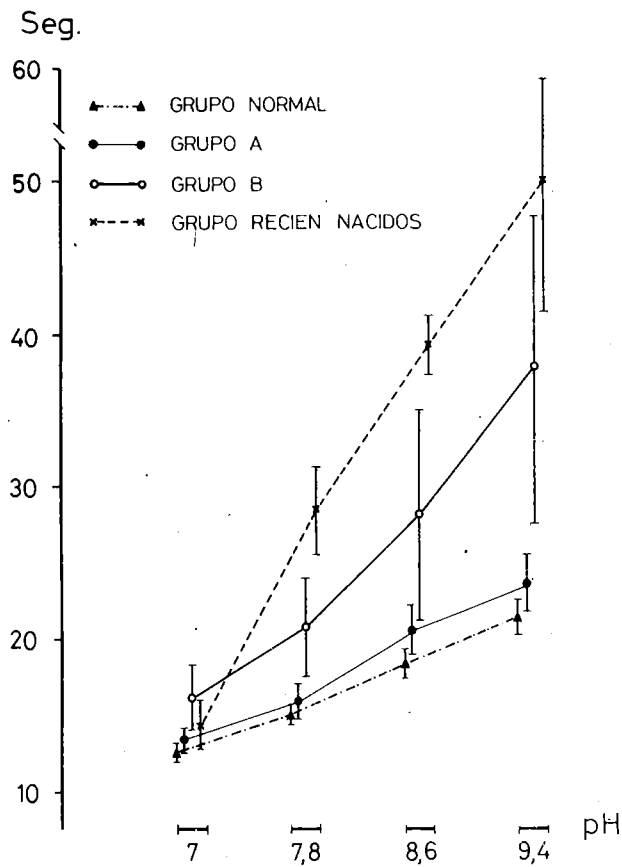


Figura 1.— Modificaciones del tiempo de trombina al alcalinizar el plasma.



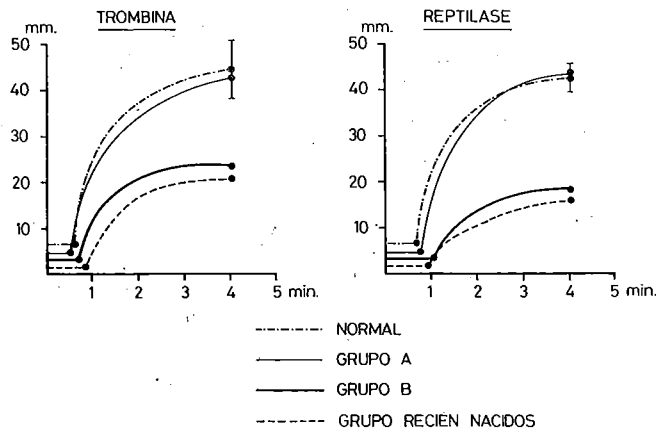


Figura 2.— Polimerización de los monómeros de fibrina inducida por trombina o reptilase

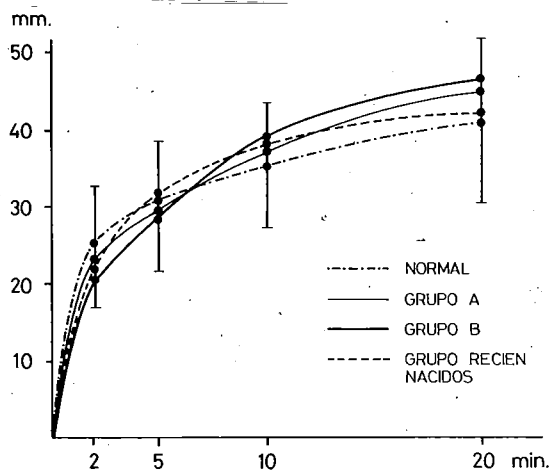


Figura 3.— Liberación de fibrinopéptidos A y B

diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ). Sin embargo los enfermos cirróticos del grupo A sólo presentaban diferencias significativas ( $p < 0,02$ ) respecto al grupo control al alcalinizar el plasma por encima de 8,6.

La polimerización de los monómeros de fibrina (figura 2), utilizando como agentes inductores trombina y reptilase, fue normal en los enfermos cirróticos del grupo A. En los del grupo B existía una clara alteración en la agregación ( $p < 0,001$ ) con ambos agentes inductores, mientras que el tiempo de latencia sólo era patológico cuando se utilizaba reptilase como agente inductor. En el plasma de los recién nacidos existía una clara alteración ( $p < 0,001$ ) de todos los parámetros medidos tanto con trombina como con reptilase.

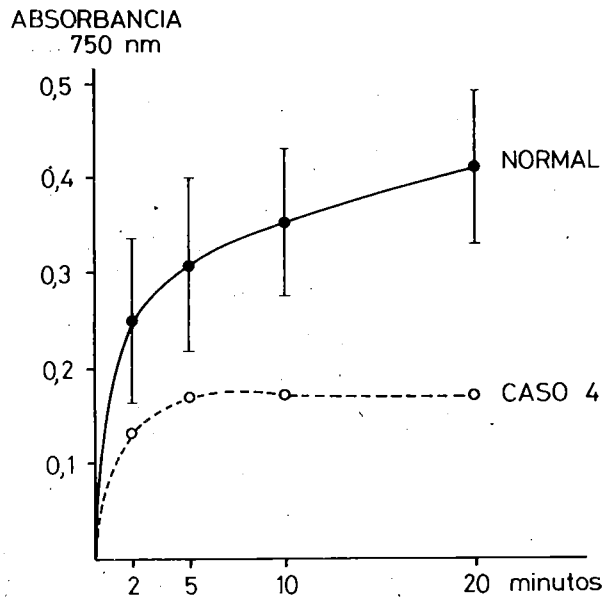


Figura 4.— Anómala liberación de fibrinopéptidos A y B de uno de los enfermos cirróticos en comparación con el grupo control

## 2.— Estudios realizados en el fibrinógeno purificado

### A) Pruebas funcionales

El índice de coagulabilidad en el grupo control presentaba unos valores de  $96,00 \pm 2,00$  por ciento. Los enfermos del grupo A tenían un índice de  $95,88 \pm 54$  por ciento, mientras que en los del grupo B existía una clara disminución ( $p < 0,001$ ) con valores de  $84,43 \pm 9,64$ . En los recién nacidos había, así mismo, un descenso significativo ( $p < 0,001$ ) del índice de coagulabilidad con valores de  $90,80 \pm 1,64$  por ciento.

La liberación de fibrinopéptidos A y B fue normal en todos los grupos estudiados (cuadro IV y figura 3), destacando el hecho de que uno de los enfermos del grupo B, presentaba una clara disminución de la liberación (figura 4).

La estabilización de la fibrina, inducida por trombina o reptilase, fue normal en todos los enfermos del grupo A y en los recién nacidos, así como en 10 de los 14 enfermos del grupo B. En los 4 restantes existían alteraciones que fueron de dos tipos diferentes. Tres de los enfermos presentaban, en la estabilización inducida por trombina, la presencia de tres nuevas bandas de mayor peso molecular (figura 5), mientras que cuando se inducía con reptilase (figura 6) aparecía un patrón heterogéneo con desdoblamiento de varias de las bandas existentes. En el cuarto caso se observó (figura 5) la presencia de dos bandas similares a las fracciones correspondientes a las cadenas  $\beta\beta$  y  $\gamma$  de su fibrinógeno purificado, al inducir la estabilización con trombina, mientras que cuando era inducida por reptilase (figura 6) aparecía un desdoblamiento de las bandas de alto peso molecular.

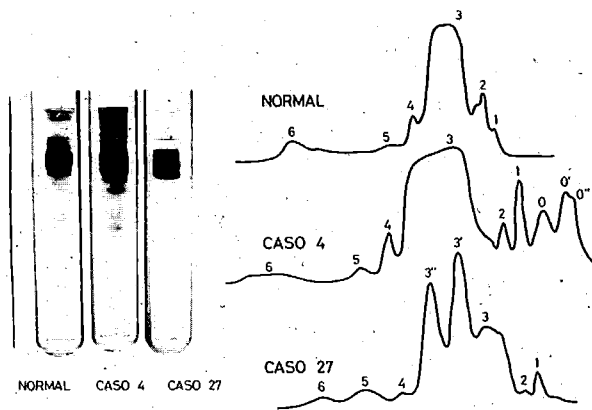


Figura 5.— Diferencias en la estabilización de la fibrina, inducida por trombina, en un sujeto normal y dos enfermos cirróticos

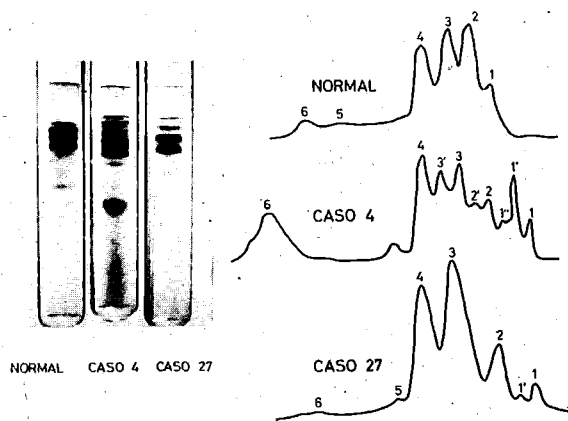


Figura 6.— Diferencias en la estabilización de la fibrina, inducida por reptilase, en un sujeto normal y dos enfermos cirróticos

#### B) Digestión por plasmina del fibrinógeno y la fibrina

En ambos casos el estudio se realizó empleando una técnica de inmunoelectroforesis y otra de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Mediante este último método no se observaron diferencias, en ninguno de los grupos estudiados respecto al grupo control, ni en la fibrinólisis ni en la fibrinólisis.

Empleando la técnica de inmunoelectroforesis la digestión por plasmina de la fibrina fue normal en todos los casos. La digestión del fibrinógeno fue, así mismo, normal en los enfermos del grupo A y en los recién nacidos; por el contrario en 5 de los 14 enfermos del grupo B se observó (figura 7) un entrecimiento en la aparición de los productos de degradación del fibrinógeno, siendo normal en los 9 restantes.

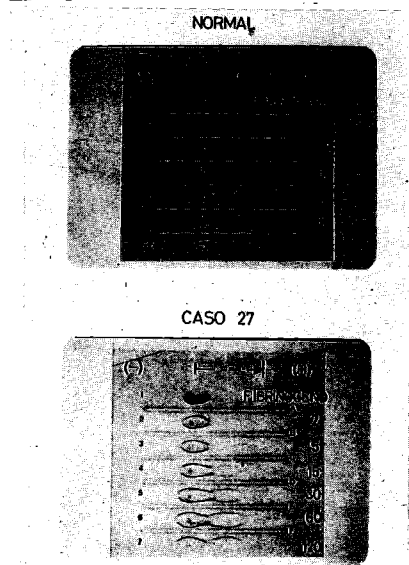


Figura 7.— Estudio inmunoelectroforético de la digestión por plasmina del fibrinógeno purificado en un sujeto normal y uno de los enfermos cirróticos.

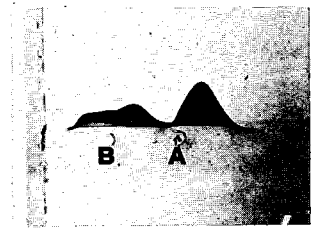


Figura 8.— Movilidad electroforética anormal del fibrinógeno de un enfermo cirrótico (B) en comparación con el control (A).

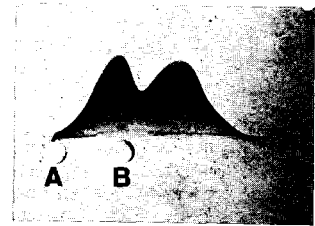


Figura 9.— Identidad antigénica total entre los fibrinógenos purificados de un sujeto del grupo control (A) y uno de los enfermos cirróticos (B)

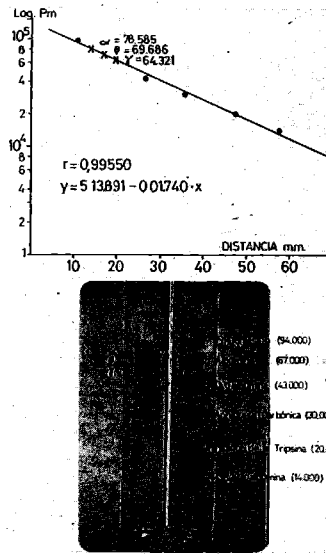


Figura 10.— Peso molecular de las cadenas del fibrinógeno purificado.

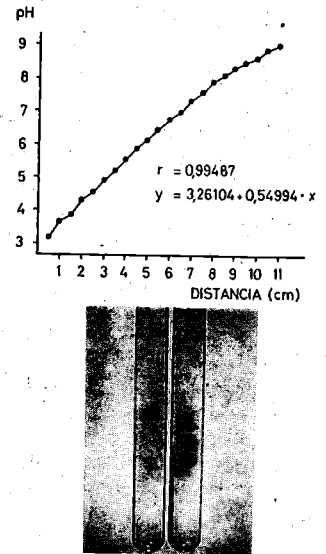


Figura 11.— Punto isoeléctrico del fibrinógeno purificado

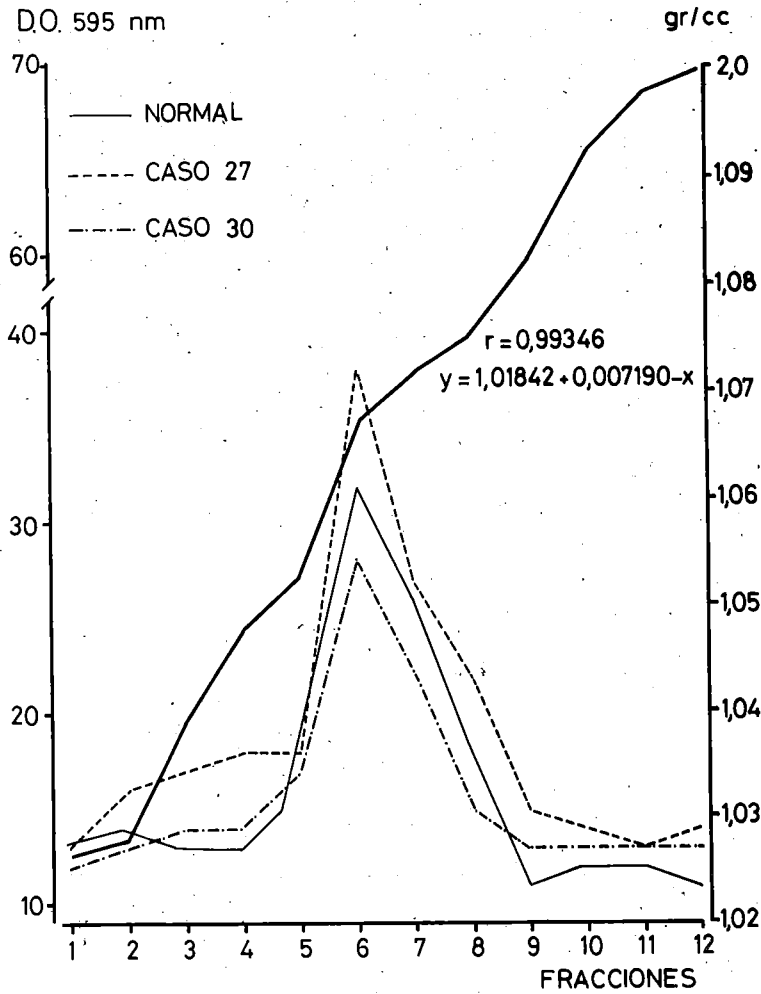


Figura 12.— Determinación del coeficiente de sedimentación del fibrinógeno purificado en uno de los sujetos del grupo control y dos de los enfermos cirróticos.

### C) Características fisicoquímicas de la molécula de fibrinógeno

La movilidad electroforética fue estudiada mediante tres técnicas diferentes, siendo normal en todos los casos del grupo A, en los recién nacidos y en 13 de los 14 enfermos del grupo B; en el caso restante existía (figura 8) una movilidad catódica con un perfil anómalo cuando el estudio se realizaba por electroforesis bidimensional.

La identidad antigénica (figura 9), peso molecular (figura 10), punto isoelectrico (figura 11), coeficiente de sedimentación (figuras 12 y 13) y análisis de aminoácidos (figura 14) fueron normales en todos los casos estudiados.

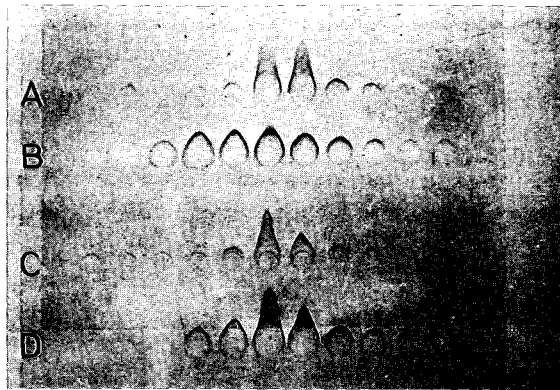


Figura 13.— Electroinmunoensayo de las diferentes fracciones en la determinación del coeficiente de sedimentación del fibrinógeno purificado de uno de los sujetos del grupo control (A) y tres de los enfermos cirróticos (B, C y D)

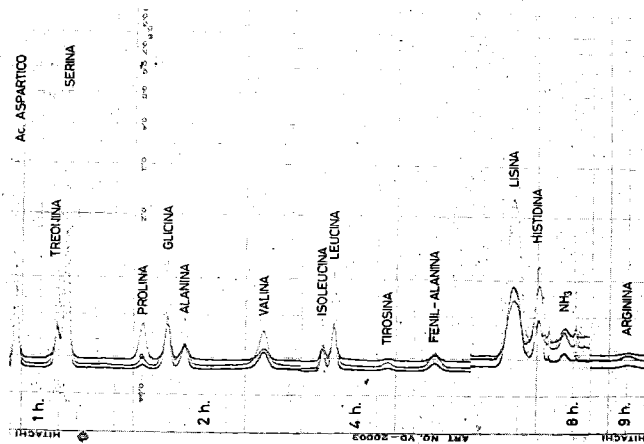


Figura 14.— Análisis de aminoácidos del fibrinógeno purificado

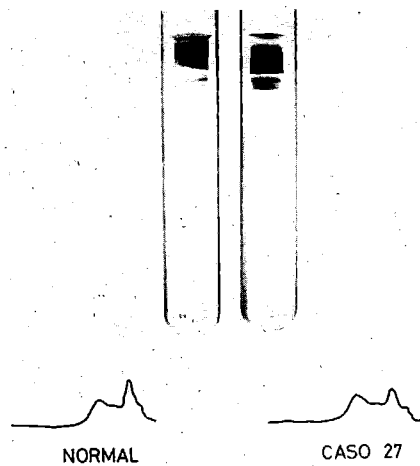


Figura 15.— Medida de las fracciones de alto y bajo peso molecular del fibrinógeno purificado en un sujeto normal y uno de los enfermos cirróticos

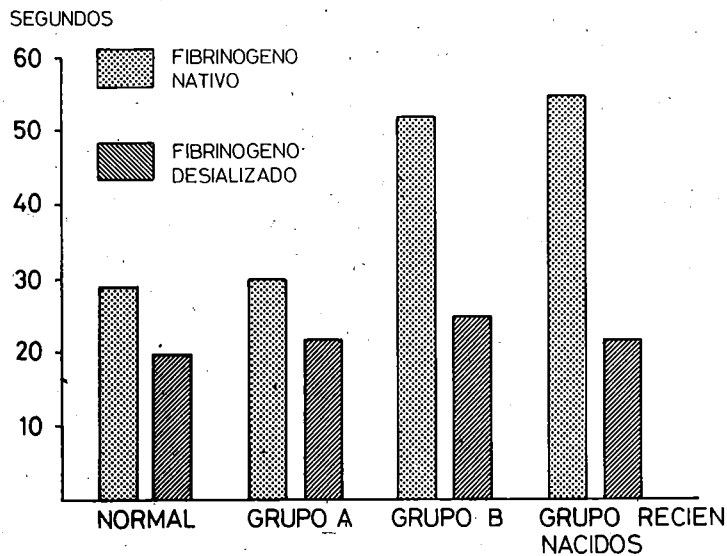


Figura 16.— Medida del tiempo de trombina del fibrinógeno purificado nativo y desializado en los diferentes grupos estudiados

*D) Estudio de las fracciones de alto y bajo peso molecular del fibrinógeno*

Dichas fracciones presentaron unos valores normales de  $54,90 \pm 0,35$  y  $46,70 \pm 28$  por ciento respectivamente, no existiendo alteraciones en ninguno de los casos, salvo en un enfermo del grupo B, que presentaba una ligera inversión con valores de 48,47 por ciento y 51,33 por ciento respectivamente para las fracciones de alto y bajo peso molecular (figura 15).

*E) Estudio de la fracción glucídica de la molécula de fibrinógeno*

El contenido de ácido siálico y hexosaminas así como la relación entre ambos (cuadro V) fue normal en los enfermos del grupo A. En los enfermos del grupo B existía un aumento de ácido siálico y disminución de hexosaminas, con el consiguiente incremento de la relación entre ambos, en ambos casos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En los recién nacidos había un aumento del contenido de ácido siálico y de la relación ácido siálico/hexosaminas, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ), mientras que la tasa de hexosaminas era normal.

Al comparar los tiempos de trombina del fibrinógeno purificado nativo y tras remover del mismo el contenido de ácido siálico se pudo observar que en todos los casos existía un acortamiento en el fibrinógeno desializado (figura 16). Este acortamiento era mucho más pronunciado en los sujetos del grupo B (42,40 por ciento) y en los recién nacidos (60,18 por ciento) que en el grupo control (31 por ciento) y en los enfermos del grupo A (25,13 por ciento).

La movilidad electroforética, estudiada por inmunoelectroforesis, de los fibrinógenos nativo y desializado era similar en todos los grupos estudiados.

## DISCUSION

Todos los estudios realizados en los 16 pacientes incluidos en el grupo A han dado resultados normales. Sin embargo, hemos observado un alargamiento significativo en los tiempos de trombina cuando era alcalinizado el plasma a pH 8,6 y 9,4. Posiblemente esta alteración sea debida a una acción sobre la formación de los puentes de hidrógeno de los iones hidronio sobre el complejo enzima-substrato a nivel de atracciones iónicas, como han sugerido Samama y colab. (73).

Los catorce pacientes incluidos en el grupo B presentaban una alteración del tiempo de trombina y/o del tiempo de reptilase, así como de la polimerización de los monómeros de fibrina. La existencia de anomalías en dichas pruebas ha sido demostrada frecuentemente en enfermedades hepáticas crónicas, considerándose que puede ser originada por una hipofibrinogenemia de etiología diversa (9, 17, 18, 33, 65, 71), por la inhibición de la actividad enzimática de la trombina (9, 70) o por un defecto funcional de la propia molécula de fibrinógeno a nivel de la polimerización de los monómeros de fibrina (1, 2, 5, 7, 16, 26, 27, 28, 29, 39, 40, 44, 59, 62, 69, 75, 79, 82).

En ninguno de nuestros casos existía una hipofibrinogenemia que justificara las alteraciones coagulativas, ya que a los valores más o menos disminuidos que presentaban cinco pacientes con métodos coagulantes correspondían niveles normales o aumentados al determinar la concentración del fibrinógeno por técnicas protéicas.

En dos de los casos existían concentraciones de PDF en suero superiores a las normales, hecho que podría explicar las anomalías encontradas en los test que miden la fibrinoformación.

En otros tres pacientes, con alteraciones de los tiempos de trombina y reptilase y de la polimerización de los monómeros de fibrina, existían concentraciones elevadas de las gammaglobulinas (1,98 gr por ciento, 2,02 gr por ciento y 2,00 gr por ciento respectivamente). Dado que en ninguno de estos enfermos existían anomalías en las diferentes pruebas realizadas sobre fibrinógeno purificado, se puede pensar en la posibilidad de una síntesis normal del fibrinógeno por parte del hígado y que la alteraciones funcionales encontradas sean debidas a una acción antitrombínica de la fracción gammaglobulina semejante a la descrita por Soria y colab. (78) en enfermos afectados de mieloma múltiple. Este hecho podría estar de acuerdo con la hipótesis de Lane y colab. (40) que consideran que en la enfermedad hepática puede producirse una rápida alteración del fibrinógeno circulante que según Palascak y Martínez (62) podría ser atribuible al medio plasmático anormal.

En los nueve casos restantes encontramos alteraciones que permiten hablar de la existencia de una disfibrinogenemia adquirida. En todos ellos había una alteración de la fracción glucídica con aumento de ácido siálico, disminución de hexosaminas en dos casos, y aumento de la relación ácido siálico/hexosaminas en todos los enfermos. Así mismo, en los nueve enfermos existía una disminución del índice de coagulabilidad. El mecanismo por el que actúa la alteración de la fracción glucídica en la fibrinoformación ha sido discutido. Mester y Szabados (53, 54) consideran que la fracción glucídica actuaría en la orientación de la trombina sobre las uniones peptídicas en las que ejerce su acción proteolítica, y que su alteración enlentecería dicho efecto. Sin embargo, Gralnick y colab. (27) piensan que el aumento de ácido siálico daría lugar a un mayor aporte de cargas negativas a la molécula de fibrinógeno, provocando un aumento de fuerzas repulsivas electrostáticas entre los monómeros de fibrina, capaces de retardar la polimerización.

Nosotros hemos podido comprobar el efecto del ácido siálico sobre el tiempo de trombina, inicialmente patológico, encontrando una normalización del mismo una vez removido el ácido siálico de la proteína. Esta normalización del tiempo de trombina al utilizar como substrato asialofibrinógeno ha sido estudiada, obteniendo resultados similares a los nuestros, por Gentry y Alexander (24), Gralnick y colab. (27) y Martínez y colab. (48, 49).



Sin embargo, en ocho de estos nueve enfermos hemos observado, además, la presencia de otras alteraciones que no nos parecen relacionadas con las variaciones de la fracción glucídica comentadas. Dichas alteraciones se encuentran a distintos niveles funcionales, siendo posible por las características de las mismas subdividir a estos ocho enfermos en tres grupos.

En cuatro de estos pacientes hemos observado un enlentecimiento en la aparición de los productos de degradación del fibrinógeno al estudiar la acción proteolítica de la plasmina sobre el fibrinógeno purificado. Sin embargo el estudio de la degradación proteolítica de la fibrina por la plasmina aportó resultados normales. Estos hechos nos hacen pensar en la existencia de una alteración estructural a nivel del COO-terminal, lugar donde comienza la acción plasmínica (45, 56, 63), que provocaría un retraso en la acción de la plasmina. Sin embargo, el hecho de que una vez estabilizada la fibrina la proteólisis sobre la misma no esté alterada, indica la no existencia de anomalías a nivel del NH<sub>2</sub>-terminal.

Otros tres enfermos presentaban un tipo de alteración caracterizado por una anomalía en la estabilización de la fibrina. Al estabilizar la fibrina con trombina aparecieron fracciones de alto peso molecular que por su localización electroforética parecen corresponder a polímeros alfa. El que los lugares de unión entre las cadenas de A<sub>α</sub> radique tanto a nivel del COO-terminal como del NH<sub>2</sub>-terminal (22, 64) hace difícil pensar en que zona de la molécula podría encontrarse la alteración. En cualquier caso, hay que considerar la posibilidad de que puedan existir uniones defectuosas en dichos lugares que producirían fracciones de diferente peso molecular. Al estabilizar la fibrina con reptilase apareció un desdoblamiento de diversas bandas que suponemos puede producirse por un mecanismo similar. Además, en uno de estos tres enfermos existía una clara disminución de la liberación de fibrinopeptidos.

El último de los ocho enfermos citados presentó una mayor complejidad en las alteraciones tanto funcionales como fisicoquímicas. Por un lado, la desialización de su fibrinógeno purificado sólo corregía parcialmente el tiempo de trombina patológico del fibrinógeno nativo; esto hace pensar que el aumento del contenido de ácido siálico sólo tenía una participación parcial en las anomalías funcionales de la molécula. De otra parte la digestión del fibrinógeno por plasmina demostró un enlentecimiento en la aparición de los productos de degradación, similar a la que aparecía en otros cuatro enfermos, lo que hace pensar en una alteración a nivel del COO-terminal. Presentaba así mismo una alteración de la estabilización de la fibrina caracterizada por la persistencia de dos bandas electroforéticas de características similares a las cadenas B<sub>β</sub> y γ de su fibrinógeno purificado. Llamaba la atención que al inducir la formación de fibrina, como paso previo al estudio de la degradación plasmínica de la misma, con concentraciones de trombina cinco veces inferiores a las utilizadas en el estudio de la estabilización, sí se producía la misma; este hecho puede ser debido a un efecto rebote, similar al encontrado en alguna disfibrinogenemia congénita (58). El estudio, por la técnica de electroforesis bidimensional, de la movilidad electroforética del fibrinógeno demostró una tendencia catódica, así como la formación de un inmunoprecipitado de perfil anómalo. Por último, al estudiar la proporción de las fracciones de alto y bajo peso molecular del fibrinógeno hemos observado una ligera inversión en la relación entre dichas fracciones, quizá por existir una mayor tendencia a degradarse (43); relacionando este dato con la teoría de la existencia de un aumento de la fracción de bajo peso molecular en la disfibrinogenemia del cirrótico (44), no creemos que este único hecho sea suficiente para explicar las diferentes anomalías que presentaba este paciente.

En ninguno de los enfermos estudiados se encontraron alteraciones en la identidad antigénica, peso molecular, punto isoeléctrico, coeficiente de sedimentación o análisis de aminoácidos del fibrinógeno purificado.

La posibilidad de una regresión del hepatocito en la síntesis de un fibrinógeno fetal dio lugar a que estudiáramos esta variante molecular del fibrinógeno. En las pruebas realizadas en plasmas obtenidos a partir de sangre del cordón umbilical de recién nacidos,

hemos observado un alargamiento de los tiempos de trombina y reptilase, así como una disminución de la curva de polimerización y alargamiento de sus tiempos de latencia. Este último hecho podría explicarse por existir una acción más lenta de estos enzimas sobre la molécula del fibrinógeno fetal como consecuencia de la concentración de iones hidrógeno del medio. Un dato que corrobora esta hipótesis es la existencia de un mayor alargamiento en el tiempo de trombina, respecto a los otros grupos estudiados, cuando se alcaliniza el plasma.

En el estudio realizado sobre el fibrinógeno purificado a partir del plasma de recién nacidos, llama la atención el aumento de ácido siálico y de su relación con las hexosaminas, la disminución del índice de coagulabilidad, y la normalización del tiempo de trombina una vez desializado el fibrinógeno. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gralnick y colab. (27), los cuales atribuyen al aumento de ácido siálico las alteraciones coagulativas.

La existencia de una defectuosa polimerización del fibrinógeno fetal (27, 51), así como los hallazgos de Jerri y colab. (34) que observaron que las proteínas fetales podían reexpresarse postnatalmente en tejidos humanos, no sólo de tipo neoplásico sino también de regeneración no maligna, ha dado lugar a que pueda pensarse en la existencia de una liberación, en los hepatocitos de los nódulos regenerativos cirróticos, de genes fetales que codifiquen la producción de fibrinógeno (8).

Respecto a la hipótesis del aumento de ácido siálico y de la síntesis del fibrinógeno fetal por parte del hígado cirrótico (27), los datos hasta aquí expuestos hacen pensar en esa posibilidad.

El que el fibrinógeno de una disfibrinogenemia sea en realidad fibrinógeno fetal ha sido también considerado en el estudio de las disfibrinogemias congénitas por Guillin y Menache (31), los cuales observaron claras correlaciones entre el fibrinógeno fetal y el Paris I, hecho que les hace pensar en la persistencia de dicha variante del fibrinógeno en algunos casos de disfibrinogemias congénitas.

De acuerdo a lo expuesto hasta ese momento pensamos que pueden barajarse dos hipótesis, o bien la síntesis de un fibrinógeno alterado, o la existencia de anomalías proteicas en el medio plasmático capaces de alterar un fibrinógeno normal una vez secretado por el hepatocito.

En el primer caso, y teniendo en cuenta que en el fibrinógeno fetal las anomalías que presenta van desapareciendo, a medida que se produce la evolución madurativa del hígado, mientras que en el enfermo cirrótico el deterioro de los hepatocitos tiende a progresar, nos parece lógica la posibilidad de que existan diversos estadios en la alteración molecular del fibrinógeno. Inicialmente se produciría una mínima afectación no detectable analíticamente excepto al alcalinizar el plasma. Más tarde, la molécula del fibrinógeno presentaría una alteración mayor consistente en un aumento del contenido de ácido siálico, quizá porque los nódulos neoformados recuperarían la capacidad de sintetizar una proteína de características muy semejantes a las del fibrinógeno fetal. Sin embargo, a medida que aumenta el daño hepático, comenzarían a producirse alteraciones más profundas en la molécula sintetizada que llegaría a presentar grandes similitudes con las disfibrinogemias congénitas (41, 68, 73), como ocurre en algunos de los casos estudiados por nosotros. En este mismo sentido Green y colab. (28, 29) observaron anomalías en la fibrinoformación coincidiendo con un importante daño hepatocelular, mientras que aparecía una normalización del fibrinógeno al producirse la mejoría clínica y analítica de los pacientes.

Respecto a la segunda hipótesis, pensamos que una disproteinemia plasmática pueda ser capaz de alterar funcionalmente al fibrinógeno, o que una mayor concentración en el plasma de enzimas proteolíticas por la disfunción hepática pueda provocar un aumento del catabolismo de la molécula del fibrinógeno a expensas de la fracción de alto peso molecular, o bien que se produzca una menor desialización del fibrinógeno por ausencia o disminución de las enzimas encargadas de este proceso. La mayor afectación hepática conllevaría una más intensa afectación plasmática, lo que explicaría la existencia de alteraciones más complejas de las pruebas funcionales e inmunológicas del fibrinógeno.

A la vista de lo expuesto creemos que la disfibrinogenemia adquirida puede ser considerada como un hallazgo importante, y relativamente frecuente, en los pacientes con enfermedades hepatocelulares crónicas, siendo interesante su búsqueda debido a su significación clínica, particularmente como índice pronóstico y causa de diátesis hemorrágica.

#### RESUMEN

Se estudian las alteraciones de la fibrinoformación en un grupo de 30 enfermos cirróticos y en 10 recién nacidos normales. Los resultados se comparan con los de un grupo control formado por 30 adultos sanos.

En 14 de los enfermos cirróticos se evidenció un alargamiento significativo de los tiempos de trombina y reptilase y una alteración de la polimerización de los monómeros de fibrina. En 2 de estos enfermos existía un aumento de PDF y en 3 una elevación de gammaglobulinas que podían explicar las alteraciones de la fibrinoformación.

Los 9 enfermos restantes presentaban alteraciones que permitían hablar de la existencia de una disfibrinogenemia adquirida. En todos ellos había un aumento de la concentración de ácido siálico en la molécula de fibrinógeno y al remover dicho ácido siálico se producía una normalización del tiempo de trombina previamente alterado. La liberación de fibrinopéptidos era anormal en 1 de los enfermos, la estabilización de la fibrina en 4, la digestión del fibrinógeno por plasmina en 5, la movilidad electroforética del fibrinógeno en 1 y la relación de las fracciones de alto y bajo peso molecular del fibrinógeno en 1. En ninguno de los enfermos se encontraron alteraciones en la identidad antigénica, peso molecular, punto isoeléctrico, coeficiente de sedimentación o análisis de aminoácidos.

En los 10 recién nacidos existía un alargamiento de los tiempos de trombina y reptilase y una anomalía de la polimerización de los monómeros de fibrina. En el fibrinógeno purificado se observó, en todos los casos, un aumento del contenido de ácido siálico y al remover el mismo se normalizó el tiempo de trombina.

Se concluye que es frecuente la aparición de una disfibrinogenemia adquirida en el curso de una cirrosis hepática y que la misma es similar a la que aparece en el plasma de recién nacidos lo que apoya la hipótesis de que el hígado cirrótico sufre una regresión a la síntesis del fibrinógeno fetal.

#### Agradecimientos:

Deseamos expresar nuestro agradecimiento por su inestimable ayuda técnica a las Srtas. B. Sanz y P. Masset.

#### REFERENCIAS

1. Aich, M.; Roge, J.; Bury, M.F.; Durand, H.; Gueroult, N.; Chaurion, C.H.; Leclerc, M.; Justin-Besancon, L.: "Dysfibrinogenemias acquises et affections hepatiques. A propos de 30 observations". *Sem. Hop. Paris* 49: 183, 1973.
2. Alpidovsky, V.K.; Vagel, C.L.; Sadikall, F.; Primack, A.: "Blood coagulation and fibrinolysis in Ugandan patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma". *E. Afr. Med. J.* 51: 396, 1974.
3. Aminoff, D.: "Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids". *Biochem. J.* 81: 384, 1961.
4. Aznar, J.; Tascón, A.; Aznar, J.A.; Rodríguez Ineba, A.: "Técnica rápida para la valoración del Fibrinógeno por el método de precipitación por el calor". *Rev. Diag. Biol.* 23: 373, 1973.
5. Ballard, J.O.; Kelly, G.A.; Kurrika, M.D.; Sanders, J.F.; Eyster, M.E.: "Acquired dysfibrinogenemia in a hemophiliac with hepatoma: resolution of fibrinogen dysfunction following chemotherapy". *Cancer* 48: 686, 1981.
6. Barnhart, M.I.; Noonan, S.M.: "Cellular control mechanism blood clotting proteins". *Thrombos. Diathes. Haemorrh. Suppl.* 54: 59, 1973.
7. Barr, R.D.; Ovna, N.; Simpson, J.G.; Bagshawe, A.F.: "Dysfibrinogenaemia and primary hepatocellular carcinoma". *Quartely J. Med.* 45: 647, 1976.
8. Barr, R. D.; Allardyce, M.; Brunt, P. W.; Mc Phie, J. L.: "Dysfibrinogenaemia and liver cell growth". *J. Clin. Path.* 31: 89, 1978.
9. Bloom, A.L.: "Intravascular coagulation and the liver". *Brit. J. Haemat.* 30: 1, 1975.
10. Bohn, H.; Haupt, H.: "Eine quantitative bestimmung von Faktor XIII mit anti-faktor-XIII-serum". *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 19: 309, 1968.

11. Brodsky, I.; Siegel, N.H.; Kahn, S.B.; Ross, E.M.; Petkotk, G.: "Simultaneous fibrinogen and platelet survival with normal ( $Se^{75}$ ) selenomethionine in man: Studies in diseases with normal coagulation". *Brit. J. Haemat.* 19: 341, 1970.
12. Burger, L.R.; Waxman, S.; Gilbert, H.S.; Mehlman, S.; Allen, R.H.: "Isolation characterization of novel Vit. B<sub>12</sub>-binding protein associated with hepatocellular carcinoma". *J. Clin. Invest.* 56: 1262, 1975.
13. Cessi, C.; Pillego, F.: "The determination of amino sugars in the presence of amino acids and glucose". *Biochem. J.* 77: 508, 1960.
14. Glauss, A.: "Gerinnungsphysiologische Schnell-methode zur Bestimmung des Fibrinogens". *Acta Haemat.* 17: 232, 1957.
15. Crane, L.J.: "Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes". *J. Cell. Biol.* 72: 11, 1977.
16. Dettori, A.G.; Ponari, O.; Civardi, E.; Megha, A.; Pini, M.; Poti, R.: "Impaired fibrin formation in advanced cirrhosis". *Haemostasis* 6: 137, 1977.
17. Escrivá, A.; Espinós, E.; Villegas, A.; Díaz-Mediavilla, J.; Gilsanz, V.: "Coagulation intravascular diseminada en las hepatopatías. XIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia". Vigo, 1970.
18. Escrivá, A.; Pérez, P.; Espinós, E.; Gilsanz, V.: "Coagulación intravascular diseminada en hepatonecrosis aguda. XIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia". Málaga, 1971.
19. Von Felten, A.; Werner Straub, P.; Frick, P.G.: "Disyfibrinogenemia in a patient with primary hepatoma. First observation of in acquired abnormality of fibrin monomer aggregation". *New. Engl. J. Med.* 280: 405, 1969.
20. Fernández, J.; Angulo, P.; San Martín, B.; Goñi, M.: "Electroforesis bidimensional. II. Métodos de Identificación de inmunoprecipitados (Gel intermedio y electroforesis transem)". *Rev. Diag. Biol.* 27: 11, 1978.
21. Fernández, J.; Lasierra, J.; Narvaiza, M.J.; Vilades, E.; Palacios, E.; Rocha, E.: "Fibrinogen Logroño. A new fibrinogen molecular variant". *Thrombos. Haemostas.* 42: 138, 1979. (Abstract)
22. Fretto, L.J.; Ferguson, E.W.; Steinman, H.M.; Mc Kee, P.A.: "Localization of the -chain cross-link acceptor sites of human fibrin". *J. Biol. Chem.* 253: 2184, 1978.
23. Gadjos, A.: "Fibrinogen-Hypo- et dysfibrinogénémies héréditaires". *Nouv. Press. Med.* 2: 1067, 1973.
24. Gentry, P.A.; Alexander, B.: "Human fibrinogen and asialofibrinogen: a comparison of coagulation parameters". *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 50, 1976.
25. Grabar, P.; Williams, C.A.: "Methode immunoelectrophoretique d'analyse de melanges de substances antigeniques". *Biochem. Biophys. Acta.* 17: 67, 1955.
26. Gralnick, H.; Abrams, E.; Krollwsky, J.: "Acquired dysfibrinogenemia in hepatocellular carcinoma". *Clin. Res.* 23: 338, 1975.
27. Gralnick, H.; Givelber, H.; Abrams, E.: "Dysfibrinogenemia associated with hepatoma: increased carbohydrate content of the fibrinogen molecule". *New Engl. J. Med.* 299: 221, 1978.
28. Green, G.; Thomson, J.M.; Dymock, I.W.; Poller, L.: "Abnormal fibrin polymerization in liver disease". *Brit. J. Haemat.* 34: 427, 1976.
29. Green, G.; Oller, L.; Thomson, J.M.; Dymock, I.W.: "Association of abnormal fibrin polymerization with severe liver disease". *Gut.* 18: 909, 1977.
30. Gruendlinger, J.; Bouvier, C.A.: "Applications d'une methode photometrique a l'etude des phenomenes de coagulation et de fibrinolyse". *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 12: 425, 1964.
31. Gullin, M.C.; Menache, D.: "Fetal fibrinogen and Fibrinogen Paris I: comparative fibrin monomer aggregation studies". *Throm. Res.* 3: 117, 1973.
32. Higashimo, K.; Hashinotsume, M.: "Studies in a variant alkaline phosphatase in sera of patients with hepatocellular carcinoma". *Clin. Chim. Acta* 40: 67, 1972.
33. Hillebrand, P.; Parbhoo, S.P.; Jadrychowski, A.; Sherlock, S.: "Significance of intravascular coagulation and fibrinolysis in hepatic failure". *Gut* 15: 83, 1974.
34. Jerry, L.M.; Lewis, M.G.; Rowden, G.; Sullivan, A.K.; Pitzele, R.; Law, T.: "Fetal antigen in non-neoplastic conditions". *Cancer Res.* 36: 3446, 1976.
35. Jim, R.T.S.: "A study of the plasma thrombin time". *J. Lab. Clin. Med.* 50: 45, 1957.
36. Krause, W.H.; Heene, D.L.; Lasch, H.G.: "Congenital disyfibrinogenemia (Fibrinogen Giessen). *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 28: 547, 1973.
37. Kwaan, H.C.: "Trastornos de la fibrinolisis". *Clin. Med. North.* 5: 163, 1972.
38. Kwan, S.W.; Fuller, G.M.: "Immunochemical characterization of fibrinogen induction in rat liver". *Biochim. Biophys. Acta* 475: 659, 1977.
39. Lane, D.A.; Schwily, M.F.; Thomas, D.P.; Kakkar, V.V.; Woold, I.L.; Williams, R.: "Acquired dysfibrinogenemia in Acute and Chronic liver disease". *Brit. J. Haemat.* 35: 301, 1977.
40. Lane, D.A.; Scully, M.F.; Kakkar, V.V.: "Prolonged thrombin clotting times in liver disease". *Thromb. Res.* 10: 773, 1977.
41. Lasierra, J.; Vilades, E.; Narvaiza, M.J.: "Aspectos biológicos de las disyfibrinogenemias congénitas". *Sangre* 23: 631, 1978.
42. Laurell, C.B.: "Electroimmunoassay". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 (suppl.): 124, 1972.

43. Lipinska, I.; Lipinski, B.; Gurewich, V.: "The heterogeneity of human fibrinogen. Demonstration of two clottable protein components in normal plasma and isolated fibrinogen fraction". *J. Lab. Clin. Med.* 84: 509, 1974.
44. Lipinski, B.; Gurewich, V.; Lipinska, I.: "Thrombin time prolongation in cirrhosis in relation to enhanced fibrinogen degradation". *Thromb. Res.* 10: 185, 1977.
45. Marder, V.J.; Brudzynski, A.Z.: "Degradation products of fibrinogen and crosslinked fibrin. Projected clinical applications". *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 32: 49, 1974.
46. Marshall, J.S.; Green, A.M.; Pensky, J.; Williams, S.; Zinn, A.; Carlson, A.M.: "Measurement of circulating desialylated glycoproteins and correlation with hepatocellular damage". *J. Clin. Invest.* 54: 555, 1974.
47. Martínez, J.; Palascak, J.; Kwasniak, D.: "Role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with liver disease". *Thrombos. Haemostas.* 38: 169, 1977.
48. Martínez, J.; Palascak, J.; Peters, C.: "Functional and metabolic properties of human asialofibrinogen". *J. Lab. Clin. Med.* 89: 367, 1977.
49. Martínez, J.; Palascak, J.; Kwasniak, D.: "Abnormal sialic acid content of the dysfibrinogenemia associated with liver disease". *J. Clin. Invest.* 61: 535, 1978.
50. Mc Even, C.R.: "Tables for estimating sedimentation trough linear concentration gradients of sucrose solution". *Anal. Biochem.* 20: 114, 1967.
51. Merino, J.; García-Conde, J.; Benet, I.: "Estudio funcional de la fibrinoformación en la sangre del recién nacido". *Sangre* 2: 439, 1977.
52. Merskey, C.; Lalezari, P.; Johnson, A.J.: "A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum". *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 131: 871, 1969.
53. Mester, L.; Szabados, L.: "Differences constitutionnelles et fonctionnelles entre les fragments glucidiques du fibrinogene humain normal et d'un fibrinogene humain anormal". *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50: 2561, 1968.
54. Mester, L.; Szabados, L.: "Differences constitutionnelles dans les fragments glucidiques d'un fibrinogene humain anormal". *C.R. Acad. Sci. Paris* 266: 34, 1968.
55. Mester, L.; Szabados, L.: "Structures defectueuse et biosynthesis des fractions glucidiques du Fibrinogene". *Nouv. Rev. Franc. d'Hemat.* 10: 679, 1970.
56. Mosseson, M.W.; Galanakis, D.F.; Finlayson, J.S.: "Comparison of human plasma fibrinogen subfractions and early plasminic fibrinogen derivatives". *J. Biol. Chem.* 249: 4656, 1974.
57. Muruyama, K.; Shuido, N.: "Recommended method for the analysis of amino acids in biological materials". *J. Chromatography* 143: 137, 1977.
58. Narvaiza, M.J.; Villades, E.; Rocha, E.; Perera, C.; Fernández, J.; Lasiera, J.: "Fibrinógeno Logroño. I. Estudio clínico, biológico y funcional. (abst.)". *Sangre* 24: 85, 1979.
59. Narvaiza, M.J.; Cuesta, B.; Fernández, J.; Hernández, M.; Solana, J.M.; Rocha, E.: "Estudio de la polimerización de los monómeros de fibrina en procesos hepáticos". *Sangre* 24: 389, 1979.
60. Narvaiza, M.J.: "Contribución al estudio de las alteraciones funcionales y fisicoquímicas del fibrinógeno en la cirrosis hepática". Tesis Doctoral. Pamplona, 1979.
61. Narvaiza, M.J.; Fernández, J.; Cuesta, B.; Paramo, J.A.; Rocha, E.: "Role of sialic acid in the acquired dysfibrinogenemia associated with liver cirrhosis. VI Meeting of the European and African Division International Society of Haematology". Abstract: 317, 1981.
62. Palascak, J.E.; Martínez, J.: "Dysfibrinogenemia associated with liver disease". *J. Clin. Invest.* 60: 89, 1977.
63. Pizzo, S.V.; Schwartz, M.L.; Hill, R.L.: "The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen". *J. Biol. Chem.* 247: 636, 1972.
64. Pizzo, S.V.; Schwartz, M.L.; Hill, R.L.; Mc Kee, P.A.: "The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin". *J. Biol. Chem.* 248: 4574, 1973.
65. Rake, M.O.; Flute, P.T.; Pannell, G.; Williams, R.: "Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis". *Lancet* 1: 533, 1970.
66. Ratnoff, O.D.; Menzie, C.: "A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma". *J. Lab. Clin. Med.* 37: 316, 1951.
67. Ratnoff, O.D.: "An accelerating properly of plasma for the coagulation of fibrinogen by thrombin". *J. Clin. Invest.* 33: 1175, 1954.
68. Ratnoff, O.D.; Forman, W.B.: "Criteria for the differentiation of Dysfibrinogenemia States". *Sem. Hemat.* 13: 141, 1976.
69. Ratnoff, O.D.: "The hemostatic defects of liver disease. En: *Haemostatic: Biochemistry, Physiology and Pathology*". Pág. 446. Ed. Ogston, D. y Bennett, B. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1977.
70. Rocha, E.; López Borrascas, A.: "Niveles circulantes de productos de degradación del fibrinógeno y monómeros de fibrina en Cirrosis hepática". *Rev. Med. Univ. Navarra* 18: 143, 1974.
71. Rocha, E.; Marín, J.; Ortega, J.; López Borrascas, A.: "Alteraciones de la hemostasia en las enfermedades hepáticas. I. Valor de las pruebas biológicas en el diagnóstico de estas afecciones". *Rev. Clin. Esp.*, 136: 219, 1975.
72. Rocha, E.; Marín, J.; López Borrascas, A.: "Cirrosis hepática y aclaramiento de activadores de la fibrinolisis". *Rev. Clin. Esp.* 142: 141, 1976.
73. Samama, M.; Soria, J.; Soria, C.: "Congenital and acquired dysfibrinogenemia. En: *Recent advances in blood coagulation (2)*". p. 313. Ed. Poller, L. Churchill Livingstone. Edinburgh, London and New York, 1977.

74. Schachter, H.; Jabbal, I.; Hudgin, R.L.; Pinteric, L.: "Intracellular localization of liver sugar-nucleotide-glycoproteins-glucosyltransferase in a Golgi-rich fraction". *J. Biol. Chem.* 246: 1090, 1970.
75. Soria, J.; Soria, C.; Samama, M.; Coupier, J.; Girard, M.L.; Bousser, J.; Bilski-Pasquier, G.: "Dysfibrinogenemia acquies dans les atteintes hepatoques severes". *Coagulation* 3: 37, 1970.
76. Soria, J.; Soria, C.; Durand, G.; Feger, J.: "Electrofocalisation de fibrinogenes anormaux en gel de polyacrilamide". *Ann. Biol. Clin.* 30: 161, 1972.
77. Soria, J.; Soria, C.; Giraud, M.L.; Samama, M.: "Troubles de la fibrinofornación. Technique d'apretation du primer stade". *Path. Biol.* 20: 315, 1972.
78. Soria, J.; Soria, C.; Samama, M.; Fine, J.M.; Bousser, J.: "Analysis of a Fibrin formation abnormality in a case of multiple myeloma". *Scand. J. Haemat.* 15: 207, 1975.
79. Soria, J.; Soria, C.; Ryckewart, J.J.; Samama, M.; Thomson, J.M.; Poller, L.: "Study of acquired dysfibrinogenemia in liver disease". *Thromb. Res* 19: 29, 1980.
80. Straub, P.W.; Funk, C.: "The reptilase time in presence of fibrinogen degradation products". *Scand. J. Haemat. suppl.* 13: 257, 1971.
81. Sucharib, B.; Knufermann, H.; Hoelze Wallach, D.F.: "Separation of EDTA-extractable erythrocyte membrane proteins by isoelectric focussing linked to electrophoresis in sodium dodecyl sulfate". *Biochim. Biophys. Acta* 345: 448, 1974.
82. Verhaeghe, R.; VandDamme, V.; Molla, A.; Vermeylen, J.: "Dysfibrinogenemia associated with primary hepatoma". *Scand. J. Haemat.* 9: 451, 1972.
83. Waxman, S.: "The clinical and physiological implications of hepatoma B<sub>12</sub> binding proteins". *Cancer Res.* 37: 1908, 1977.
84. Waxman, S.: "The clinical and physiological implications of hepatoma B<sub>12</sub> binding proteins". *Cancer Res.* 37: 1908, 1977.
85. Weber, K.; Osborn, M.: "The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis". *J. Biol. Chem.* 244: 4406, 1969.