

Nuevos aspectos clínicos y biológicos de la fibrinólisis

COORDINADORES: P. MARCO. *Alicante*
J.C. REVERTER. *Barcelona*

Resumen del simposio

El simposio, dedicado a ofrecer una visión global sobre la fibrinólisis tanto desde el punto de vista del conocimiento fundamental como de su aplicación clínica, se inicia con la presentación de la Dra. A. Estellés. En ella comenta las modificaciones del sistema fibrinolítico que se han descrito en las enfermedades endocrinas. La ponente revisa primero el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la obesidad, donde se han identificado cambios importantes con hipercoagulabilidad e hipofibrinólisis, debida fundamentalmente a un exceso de PAI-1, aunque también se ha asociado el síndrome metabólico con niveles aumentados de TAFI. En segundo lugar, se centra en el síndrome del ovario poliquístico, donde la alteración del PAI-1, debida a la presencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, se ha correlacionado con su desarrollo. Finalmente, revisa los hallazgos en el hipertiroidismo, donde hay hipofibrinólisis y disfunción endotelial, y en el hipotiroidismo, donde las alteraciones pasan de la hipofibrinólisis a la hiperfibrinólisis con el aumento de la gravedad de la afección tiroidea.

La segunda ponencia, presentada por el Dr. J. Álvarez Sabín, comenta la actualidad de la trombolisis en el ictus isquémico. Para ello, primero revisa los estudios pivotaes en que se basa su empleo y luego el ponente señala los retos del futuro de la trombolisis en el ictus, a parte de la propia indicación del t-PA. Estos retos considera que son lograr que sea accesible a un mayor número de pacientes con ictus, mejorar la eficacia terapéutica y ampliar la ventana temporal para su uso. Asimismo, expone las nuevas alternativas terapéuticas de la fibrinólisis, que pueden ser farmacológicas, como los nuevos trombolíticos, o basadas en acciones físicas o mecánicas, como la sonotrombolisis, las microburbujas o la lisis mecánica. Resulta de especial interés la revisión de la combinación del t-PA con inhibidores de las metaloproteasas, que parece que puede mejorar la eficacia del tratamiento, disminuir el edema cerebral y controlar la hemorragia asociada a la trombolisis.

En la tercera ponencia, la Dra. J. Orbe realiza una revisión del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas, implicadas en la angiogénesis y la remodelación vascular y relacionadas con la enfermedad aterotrombótica, y explica la importante relación existente entre fibrinólisis y proteólisis. En su ponencia aporta resultados de investigaciones originales de su grupo sobre la metaloproteasa MMP-10 en la aterotrombosis, en los que se demuestra su expresión en las placas ateroscleróticas inflamatorias y en fase de ruptura. En estos estudios también han probado que la MMP-10 puede favorecer la lisis del coágulo inducida por t-PA disminuyendo la activación del TAFI, lo que le confiere un papel profibrinolítico. Finalmente, revisa las pruebas de laboratorio que estudian la fibrinólisis y las metaloproteasas, destacando la necesidad de estudios que las correlacionen con estudios clínicos en patología aterotrombótica, para establecer su utilidad en la identificación de los pacientes de riesgo vascular.

En la ponencia final, la Dra. A.M. Lauricella revisa la importancia que tiene la estructura de la fibrina en su capacidad para ser lisada, y que ello puede tener relevancia en diferentes patologías, en las que puede permanecer por tiempo prolongado en circulación, induciendo la formación de más trombo, o degradarse anticipadamente, causando riesgo hemorrágico. Explica la variedad de estructuras que puede adoptar la fibrina, lo que modifica sus características y el papel de sus determinantes principales (fibrinógeno, trombina y factor XIII) y revisa las pruebas de laboratorio que se han desarrollado para evaluarla funcionalmente. Por último, comenta cómo la estructura de la fibrina afecta a su propia facilidad para ser lisada, incluyendo el papel de la misma como cofactor de la fibrinólisis, y estudia cómo se ve modificada su estructura y su sensibilidad a la lisis en distintas entidades, incluyendo los estudios de su grupo evaluando el efecto de la homocisteína.

FIBRINOLISIS Y ENFERMEDADES ENDOCRINAS

A. ESTELLÉS¹, E. ZORIO^{2,5},
J. GILABERT-ESTELLÉS³, L.A. RAMÓN^{1,4},
A. BRAZA BOÏLS^{1,5}, F. ESPAÑA¹

¹Centro de Investigación; ²Servicio de Cardiología;
³Servicio de Ginecología; ⁴RECAVA; ⁵Fundación
para la Investigación del Hospital Universitario
La Fe. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de una proenzima, el plasminógeno, en su forma proteolíticamente activa, la plasmina, la cual es capaz de degradar la fibrina y, así, eliminar el coágulo previamente formado¹ (Figura 1). La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominadas activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA).

Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina, genera productos de degradación de la fibrina con residuos de lisina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen sitios de unión para el tPA y el plasminógeno y por ello son responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis. Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema global².

La inhibición de la fibrinólisis se ejerce a varios niveles (Figura 1). Por una parte, están los inhibidores de los activadores del plasminógeno. El principal inhibidor de la fibrinólisis *in vivo* es el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 o PAI-1, el cual se sintetiza no sólo en el endotelio vascular sino también en el hígado³. Otros inhibidores son el PAI-2, fundamentalmente de origen placentario, del que sólo se detectan niveles plasmáticos significativos en mujeres gestantes^{4,5}, y el PAI-3, que más tarde se identificó como el inhibidor de la proteína C⁶, el cual presenta una mayor concentración plasmática pero una menor actividad antifibrinolítica. También se ha descrito otro mecanismo que regula negativamente la activación del plasminógeno, la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI)⁷. Se sabe que los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada sirven de anclaje al plasminógeno y al tPA. Cuando el plasminógeno y el tPA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina, tiene lugar la activación del plasminógeno en plasmi-

na. Pues bien, precisamente a ese nivel el TAFI, una vez activado por la trombina (TAFIa), es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, impidiendo la activación del plasminógeno en plasmina y, por lo tanto, limitando la cascada de la fibrinólisis.

La fibrinólisis también se regula una vez que el plasminógeno ha sido ya activado y transformado en plasmina (Figura 1). Así, la actividad proteolítica de la plasmina está regulada por la acción de la α_2 -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico, y, en menor medida, por la α_2 -macroglobulina y el TAFIa.

Éstos son, básicamente, los factores implicados en la fibrinólisis, de tal modo que una correcta hemostasia depende del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas. Por otra parte, el equilibrio entre ellas se encuentra íntimamente relacionado con la coagulación. Hay que resaltar que no se trata de un equilibrio estático, sino tremendamente dinámico y adaptable a diferentes situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

Fibrinólisis y enfermedades endocrinas

Desde hace tiempo se han asociado diversas enfermedades endocrinas con modificaciones del sistema hemostático, en general, y del sistema fibrinolítico, en particular. Generalmente, se han observado modificaciones en la coagulación, las plaquetas, el endotelio vascular y la fibrinólisis, que se asocian también con

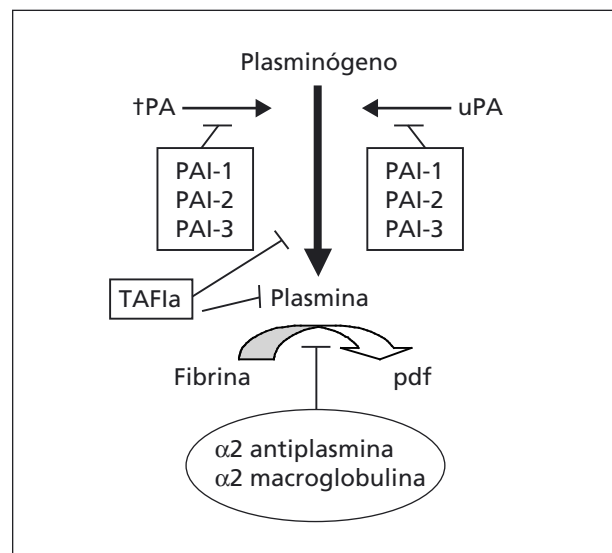


Figura 1. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; pdf: productos de degradación de la fibrina; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa.

riesgo de enfermedad cardiovascular. Dentro de las enfermedades endocrinas y su relación con las modificaciones del sistema fibrinolítico vamos a tratar más específicamente el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la obesidad, el síndrome del ovario poliquístico y las enfermedades tiroideas.

Síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad y fibrinólisis

Probablemente, el mecanismo fisiopatológico que enlaza la obesidad con las patologías metabólicas asociadas a la misma sea la resistencia a la insulina. Se define dicha resistencia como la disminución de la acción biológica de la insulina sobre los tejidos insulino-dependientes, donde se incluyen el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. En comparación con la grasa subcutánea, la grasa visceral es más resistente a las acciones de la insulina y más sensible a las hormonas lipolíticas. El aumento de la llegada de ácidos grasos libres al hígado a través del sistema porta es responsable de la dislipemia característica de la obesidad, da lugar a una mayor disponibilidad de sustrato para la síntesis hepática de triglicéridos⁸ y, asimismo, contribuye a generar resistencia a la insulina a nivel hepático, inhibiendo la captación y oxidación de glucosa y la síntesis de glucógeno, y aumentando la liberación hepática de glucosa⁹.

El síndrome metabólico es una entidad clínica de rasgos heterogéneos caracterizada por la presencia de, al menos, tres de las siguientes alteraciones: obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus tipo 2 y/o resistencia insulínica, dislipemia (niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de HDL colesterol) e hipertensión arterial^{10,11}.

Aunque la prevalencia de los componentes del síndrome metabólico aumenta en pacientes obesos, es importante reseñar que no todos los sujetos obesos desarrollan el síndrome metabólico y que incluso individuos no obesos pueden ser diagnosticados de síndrome metabólico.

Con relación al sistema fibrinolítico se ha indicado que los sujetos afectados de síndrome metabólico tienen un tiempo de lisis del coágulo alargado¹², parcialmente debido al aumento de los niveles circulantes de PAI-1, que es la alteración más importante de la hemostasia en el síndrome metabólico¹³. Muchos autores han sugerido que hay una interacción bidireccional entre los determinantes clásicos del síndrome metabólico y la sobreexpresión del PAI-1. Así, el depósito de grasa observado en el síndrome metabólico puede inducir aumento de TNF, TGF β , cortisol, angiotensina II, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y lipídico y estrés oxidativo. Todo ello aumenta la expresión de PAI-1. Por otra parte, el aumento de PAI-1 puede inter-

ferir en la diferenciación de los adipocitos y favorecer el desarrollo de la obesidad y las alteraciones glucolíticas que forman parte de la constelación del síndrome metabólico^{11,13}. Por lo tanto, el PAI-1 parece ser más que un simple marcador del síndrome metabólico, y su sobreexpresión debería considerarse un verdadero componente del síndrome metabólico con valor patogénico *per se*¹⁴ y una diana atractiva para el desarrollo de futuras terapias¹⁵.

Se ha revisado ampliamente el papel específico que tienen las alteraciones del sistema fibrinolítico relacionadas con el síndrome metabólico sobre la fisiología de la enfermedad coronaria. En general, se acepta que la actividad fibrinolítica disminuida que se observa en este contexto se relaciona con la presencia de obesidad visceral y de resistencia insulínica¹⁶. Se ha indicado que el PAI-1 parece jugar un papel clave a este nivel y su concentración está aumentada tanto en sangre como en las placas coronarias de estos pacientes^{17,18}. Aunque el aumento de los niveles de PAI-1 en sangre es el rasgo hemostático más comúnmente asociado con los componentes del síndrome metabólico^{11,16,19}, también se ha indicado que el síndrome metabólico se asocia a niveles aumentados de TAFI y ello también contribuiría a la hipofibrinólisis encontrada en dicho síndrome^{20,21}.

Además de las alteraciones de los inhibidores fibrinolíticos, también se ha implicado a otros componentes hemostáticos en las alteraciones hemostáticas del síndrome metabólico. Así, podrían contribuir a la hipercoagulabilidad observada la presencia de niveles disminuidos del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el hallazgo de niveles aumentados de factor von Willebrand, fibrinógeno, factores VIII, XIII y factores vitamina K-dependiente¹⁶. La compleja unión entre coagulación, inflamación y trombosis potencia la importancia del síndrome metabólico en la fisiopatología de la enfermedad coronaria, ya que las partículas proinflamatorias asociadas con el síndrome metabólico¹⁶ pueden multiplicar el efecto protrombótico de las alteraciones hemostáticas previamente comentadas y aumentar la vulnerabilidad de estos pacientes para el desarrollo de la enfermedad coronaria¹⁶.

En los últimos años gran cantidad de estudios clínicos respaldan la asociación entre obesidad e hipofibrinólisis a través de un incremento de los niveles plasmáticos de PAI-1^{19,22} y destacan que la actividad fibrinolítica mejora después de la pérdida de peso debido, precisamente, a una disminución en la concentración de PAI-1^{19,23,24}. El aumento de los niveles de PAI-1 en plasma se asocia fundamentalmente con la obesidad abdominal y se puede atribuir a la producción de PAI-1 por el tejido adiposo visceral y la grasa hepática²⁵⁻²⁷. Estos hallazgos sugieren que los niveles circulantes de PAI-1 reflejan la redistribución de la grasa y puede ser un biomarcador de la obesidad de origen central.

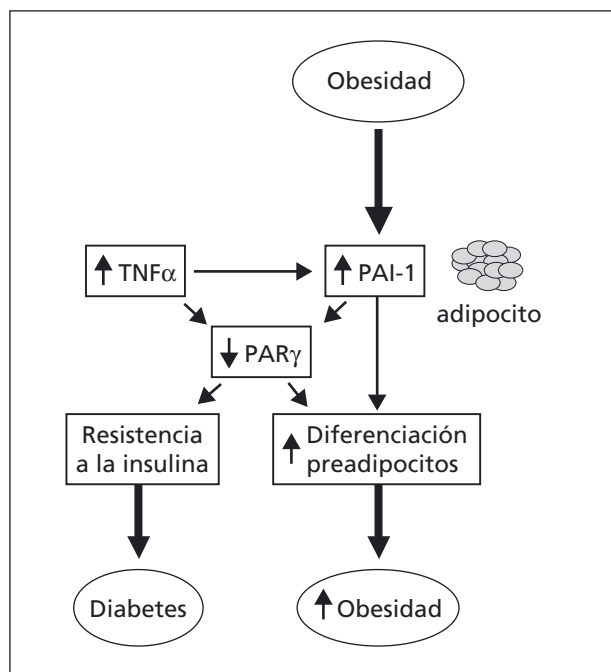


Figura 2. Relación entre PAI-1 y obesidad. Fuente: modificado de M.L. Correia, W.G. Haynes³³.

En experimentos realizados con modelos murinos a los que se les inducía obesidad, se observó que en ratones que no expresaban PAI-1 se prevenía la acumulación grasa²⁸. Por otra parte, tanto la inhibición farmacológica como la deficiencia de PAI-1 ejercían un efecto positivo sobre la obesidad y la sensibilidad a la insulina²⁹⁻³¹. Estos datos apoyan el papel del PAI-1 como futura diana terapéutica con el objetivo de reducir la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina³².

La Figura 2 resume el papel del PAI-1 en la obesidad. Se ha indicado que el aumento de la expresión de TNF α en el adipocito puede contribuir al aumento de PAI-1 en la obesidad³³ y ambos, TNF α y PAI-1, disminuir la expresión del receptor nuclear PPAR γ ³³. Puesto que el PPAR γ se ha asociado con una protección frente al riesgo de resistencia a la insulina³⁴, se ha sugerido que el bloqueo del PAI-1 podría prevenir la obesidad y la resistencia a la insulina por disminuir la inflamación y aumentar la activación del receptor PPAR γ .

Desde hace varios años se ha asociado el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 con los niveles circulantes de dicho inhibidor³⁵. Así, se ha estudiado la posible relación entre el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y la obesidad, con resultados contradictorios^{19,23,36,37}. Nuestro grupo ha encontrado una asociación entre los niveles de PAI-1 y dicho polimorfismo en niños obesos²³ y además en un trabajo reciente hemos observado que, después de la pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida, los pacientes portadores del alelo 4G presentaban unos niveles mayores

de PAI-1 que los portadores de 5G¹⁹. En dicho trabajo también se evidenció que el porcentaje de cambio del PAI-1 tras la dieta era proporcional al porcentaje de cambio del índice de masa corporal, pero también a la variación de los triglicéridos. Esto sugiere que la disminución de la adiposidad es responsable de la disminución de los niveles de PAI-1, pero que también puede estar influida por la mejora de los factores metabólicos.

Síndrome de ovario poliquístico y sistema fibrinolítico

El síndrome del ovario poliquístico se considera la enfermedad endocrina más común de las mujeres en edad reproductiva (5-10%)³⁸. Se caracteriza por anovulación crónica, infertilidad, hiperandrogenismo y resistencia a la insulina^{38,39}. En la actualidad se acepta que dicho síndrome no es sólo una enfermedad ginecológica, sino una enfermedad compleja con implicaciones metabólicas y cardiovasculares, ya que las mujeres con el síndrome del ovario poliquístico son propensas a desarrollar componentes del síndrome metabólico como son diabetes, obesidad, hipertensión arterial y dislipidemia, todos ellos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular³⁹⁻⁴¹.

La disfunción endotelial es una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Se ha indicado que diversos marcadores de la disfunción endotelial, como el PAI-1 y el factor von Willebrand, pueden estar aumentados en el síndrome del ovario poliquístico⁴²⁻⁴⁴, aunque esto no se corrobora en otros estudios⁴⁵. En general, se indica que la disfunción endotelial se asocia al síndrome del ovario poliquístico porque en el mismo existe resistencia a la insulina, hiperandrogenismo y algunos factores marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva^{42,46}.

Varios marcadores genéticos parecen implicados en la predisposición a este síndrome. Entre ellos, se ha estudiado el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, habiéndose observado una asociación entre el alelo 4G y el desarrollo del síndrome^{47,48}, mientras que otros autores no han constatado dicha asociación⁴⁹. En un reciente metaanálisis se ha descrito que las portadoras del alelo 4G tienen un aumento moderado de riesgo para desarrollar este síndrome (OR = 1,6)⁵⁰. Diversos estudios han señalado la existencia de niveles aumentados de PAI-1 en mujeres con ovario poliquístico⁴⁸, y en estudios de modelos de ratones que sobreexpresan PAI-1 se ha observado el desarrollo de ovario poliquístico⁵¹.

En relación con el otro inhibidor de la fibrinólisis, el TAFI, recientemente se ha indicado⁵² que en mujeres jóvenes con síndrome de ovario poliquístico obesas o con sobrepeso existe una disminución de la fibrinólisis debido a un aumento en los niveles de TAFI, y este

Tabla 1. Modificaciones del sistema hemostático en el hipertiroidismo

Coagulación	Cambio
Fibrinógeno, FVIII, FIX, FVII, factor von Willebrand y trombomodulina	↑
Proteína S y proteína C	↓
Antitrombina	↑=
TFPI	↑↓
<i>Fibrinólisis</i>	
PAI-1	↑
TAFI	↑↓
tPA	↑↓

Fuente: modificado de Erem⁵⁴

rasgo podría contribuir al riesgo aumentado de aterosclerosis temprana.

En otro estudio reciente se valoraron los niveles de PAI-1 y de trombospondina, un inhibidor de la angiogénesis, a nivel circulante y en grasa visceral y subcutánea, en mujeres afectas de ovario poliquístico⁵³. En este estudio se observó un aumento de PAI-1 y una disminución de trombospondina, siendo ambos parámetros corregibles tras un tratamiento con metformina. Todo ello evidencia una relación entre obesidad, resistencia a la insulina y angiogénesis en mujeres con síndrome del ovario poliquístico.

Enfermedades tiroideas y fibrinólisis

La relación entre las enfermedades tiroideas y el sistema hemostático se describió por primera vez a principios del siglo pasado. En general, el hipertiroidismo se asocia con un estado de hipercoagulabilidad, mientras que el perfil hemostático en el hipotiroidismo depende de la gravedad de la enfermedad.

Hipertiroidismo

Los pacientes con hipertiroidismo muestran una tendencia a complicaciones tromboembólicas. El riesgo, por ejemplo, de tromboembolismo cerebral aumenta en presencia de factores de riesgo como la edad, fibrilación auricular y disfunción de válvula mitral. Sin embargo, el riesgo de tromboembolismo persiste en el hipertiroidismo, independientemente de esos factores. Se ha sugerido que ello se debe a las modificaciones hemostáticas encontradas en pacientes con hipertiroidismo como son hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis y disfunción endotelial⁵⁴.

Se han descrito niveles aumentados de FVIII, FIX, FVII y fibrinógeno en pacientes con hipertiroidis-

Tabla 2. Modificaciones del sistema hemostático en el hipotiroidismo

Coagulación	Cambio
Fibrinógeno, FVII, factor tisular, FPA	↑
FV, FVIII, FIX; FV, FXI, FXII, factor von Willebrand	↓
Proteína S y proteína C	↓
Antitrombina	↑
TFPI	↑↓
<i>Fibrinólisis en hipotiroidismo moderado</i>	
Actividad fibrinolítica	↓
PAI-1, TAFI	↑
<i>Fibrinólisis en hipotiroidismo severo</i>	
Actividad fibrinolítica	↑
PAI-1	↓

Fuente: modificado de Erem⁵⁴

mo^{54,55}. Por otra parte, se ha indicado que el hipertiroidismo afecta a la función endotelial, ya que se ha observado un aumento en los niveles de trombomodulina, factor von Willebrand y moléculas de adhesión⁵⁶. Muchos de estos factores alterados vuelven a la normalidad cuando se alcanza el estado eutiroideo con terapia antitiroidea.

En relación con el sistema fibrinolítico, se ha indicado que en el hipertiroidismo existe un aumento en los niveles de PAI-1 y de TAFI⁵⁴. Sin embargo, otros autores encuentran una disminución de los niveles de TAFI, observando una correlación inversa entre TAFI y PAI-1⁵⁷. En referencia al tPA se ha descrito un aumento en sus niveles, aunque el tPA funcional podría estar disminuido⁵⁴.

Las modificaciones del sistema hemostático y fibrinolítico en el hipertiroidismo se muestran en la Tabla 1.

Hipotiroidismo

El hipotiroidismo se asocia, generalmente, con una tendencia a la hemorragia, usualmente hemorragias nasales, gingivorragia o menorragia y, más raramente, hemorragias graves después de trauma o cirugía. La patogenia de esta tendencia hemorrágica se desconoce, ya que se ha encontrado tanto hipercoagulabilidad como hipocoagulabilidad⁵⁴. Además, el hipotiroidismo se ha asociado también con cambios en el metabolismo lipídico y con aterosclerosis⁵⁴.

En el hipotiroidismo moderado, con TSH de 10 a 50 mU/L, se ha observado una disminución de la actividad fibrinolítica, reflejada por un aumento del PAI-1 y de la antiplasmina, junto con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Tabla 2). Sin embar-

go, en el hipotiroidismo grave, con TSH mayor de 50 mU/L, se ha observado un aumento de la actividad fibrinolítica con una tendencia hemorrágica⁵⁸.

Se ha descrito que los niveles de TAFI están elevados en pacientes con hipotiroidismo y que estos niveles se correlacionan con el grado de afectación tiroidea, disminuyendo significativamente con el tratamiento sustitutivo con tiroxina⁵⁹. En otros estudios se ha observado un aumento de fibrinógeno, FVII, PAI-1, antitrombina, trombomodulina y TAFI, y una disminución de FV, FVIII, factor von Willebrand, proteína C, proteína S y TFPI en pacientes con hipotiroidismo no tratado en comparación con controles. Como consecuencia de ello, se ha sugerido que los pacientes con hipotiroidismo presentan disfunción endotelial, hipofibrinólisis e hipercoagulabilidad y, por tanto, más que una tendencia a la hemorragia, este perfil hemostático sugiere un riesgo de trombosis en estos pacientes⁶⁰.

Consideraciones finales

El síndrome metabólico se acompaña de cambios importantes en el sistema hemostático que pueden favorecer el desarrollo de trombosis. La hipercoagulabilidad y la hipofibrinólisis, debida fundamentalmente a un exceso de PAI-1, contribuyen al riesgo trombótico que se asocia con este síndrome. El aumento de la expresión de PAI-1 que acompaña a la obesidad abdominal es la alteración más comúnmente asociada con el síndrome metabólico. Puesto que el PAI-1 puede también estar directamente relacionado con la fisiopatología de la obesidad, podría ser una atractiva diana terapéutica.

Se ha observado una posible asociación entre el síndrome de ovario poliquístico y el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. Sin embargo, son necesarios más estudios para investigar esta asociación, así como su interrelación con otros componentes metabólicos asociados a este síndrome.

La disfunción tiroidea modifica el balance coagulación-fibrinólisis. El hipertiroidismo se asocia con hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis y disfunción endotelial y, por tanto, con riesgo trombótico. Sin embargo, las modificaciones hemostáticas observadas en el hipotiroidismo parecen depender de la gravedad de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo se ha subvencionado parcialmente por las Ayudas de Investigación PI080185, PI070831, CP0700326 y RECAVA (RD06/0014/0004) (Instituto de Salud Carlos III) y la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Bibliografía

- Zorio E, Gilabert-Estelles J, España F, Ramon LA, Cosin R, Estellés A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem* 2008; 15: 923-9.
- Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-24.
- Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis* 1991; 5: 197-206.
- Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-24.
- Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, España F et al. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994, 84: 143-50.
- Heeb MJ, España F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987; 262: 15813-6.
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270: 14477-84.
- Herranz L, Zapata A, Grande C, Megía A, Pallardó LF. Body fat distribution, insulin mediated suppression of non-esterified fatty acids and plasma triglycerides in obese subjects. *Horm Metab Res* 1998; 30: 141-5.
- Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-6.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 433-8.
- Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 995-1000.
- Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ, EuroCLOT Investigators. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2783-9.
- Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2200-7.
- Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruijs JB, Van Gaal LF. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes* 2006; 30: 1308-14.
- Westrick RJ, Eitzman DT. Plasminogen activator inhibitor-1 in vascular thrombosis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 966-1002.
- Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; 122: 727-35.
- Sobel BE. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and vasculopathy. A reconcilable paradox. *Circulation* 1999; 99: 2496-8.
- McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CL, Sobel BE. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients. *Diabetes* 1994; 43: 104-9.
- Solá E, Vayá A, España F, Castelló R, Ramón LA, Hernández-Mijares A et al. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism. *Thromb Res* 2008; 122: 320-7.
- Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, Matsutomo R, Takebayashi K, Inukai T. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator

- inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care* 2005; 28: 2211-6.
21. Kilicarslan A, Yavuz B, Guven GS, Atalar E, Sahiner L, Beyazit Y et al. Fenofibrate improves endothelial function and decreases thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor concentration in metabolic syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 310-4.
 22. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta 1 and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 2000; 49: 1374-80.
 23. Estellés A, Dalmau J, Falcó C, Berbel O, Castelló R, España F, et al. Plasma PAI-1 levels in obese children. Effect of weight loss and influence of PAI-1 promoter 4G/5G genotype. *Thromb Haemost* 2001; 86: 647-52.
 24. Murakami T, Horigome H, Tanaka K, Nakata Y, Ohkawara K, Katayama Y et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb Res* 2007; 119: 45-53.
 25. Morange PE, Alessi MC, Verdier M, et al. PAI-1 produced *ex vivo* by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 9: 1361-5.
 26. Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M ET al. Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 173-8.
 27. Alessi MC, Bastelica D, Mavri A, et al. Plasma PAI-1 levels are more strongly related to liver steatosis than to adipose tissue accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1262-8.
 28. Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan Y, Zhang Y et al. Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 2004; 53: 336-46.
 29. Crandall DL, Quinet EM, El Ayachi S, Hreha AL, Leik CE, Savio DA et al. Modulation of adipose tissue development by pharmacologic inhibition of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2209-15.
 30. Lijnen HR, Alessi MC, Frederix L, Collen D, Juhan-Vague I. Tiplaxtinin impairs nutritionally induced obesity in mice. *Thromb Haemost* 2006; 96: 731-7.
 31. Liang X, Kanjanabuch T, Mao SL, Hao CM, Tang YW, Declerck PJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E103-E113.
 32. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy. *Thromb Haemost* 2006; 96: 698-9.
 33. Correia ML, Haynes WG. A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: from pie to PAI? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2183-5.
 34. Buzzetti R, Petrone A, Ribaudo MC, Alemanno I, Zavarella S, Mein CA et al. The common PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 1050-4.
 35. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 10739-45.
 36. Van Harmelen V, Wahrenberg H, Eriksson P, Arner P. Role of gender and genetic variance in plasminogen activator inhibitor-1 secretion from human adipose tissue. *Thromb Haemost* 2000; 83: 304-8.
 37. Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P. The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002; 45: 584-7.
 38. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1223-36.
 39. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2007; 370: 685-97.
 40. Essah PA, Wickham EP, Nestler JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 205-25.
 41. Dokras A. Cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 2008; 26: 39-44.
 42. Meyer C, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. Vascular dysfunction and metabolic parameters in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4630-5.
 43. Carmassi F, De Negri F, Fioriti R, De Giorgi A, Giannarelli C, Fruzzetti F, et al. Insulin resistance causes impaired vasodilation and hypofibrinolysis in young women with polycystic ovary syndrome. *Thromb Res* 2005; 116: 207-14.
 44. Teede HJ, Meyer C, Hutchison SK, Zoungas S, McGrath BP, Moran LJ. Endothelial function and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: the effects of medical therapy. *Fertil Steril* 2008; Nov 17 [Epub ahead of print].
 45. Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 742-6.
 46. Tarkun I, Arslan BC, Canturk Z, Turemen E, Sahin T, Duman C. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5592-6.
 47. Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK. Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48: 1589-95.
 48. Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 793-8.
 49. Walch K, Grimm C, Huber JC, Nagele F, Kolbus A, Heer LA. A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 23: 77-81.
 50. Bagos PG. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 19-26.
 51. Devin JK, Johnson JE, Eren M, Gleaves LA, Bradham WS, Bloodworth JR Jr, Vaughan DE. Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice. *J Mol Endocrinol* 2007; 39: 9-16.
 52. Adali E, Yildizhan R, Kurdoglu M, Bugdayci G, Kulusari A, Sahin HG. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in young obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2009; Apr 13 [Epub ahead of print]
 53. Tan BK, Adya R, Chen J, Farhatullah S, Heutling D, Mitchell D, Lehnert H, Randeve HS. Metformin decreases angiogenesis via NF-[kappa]B and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 566-74.
 54. Erem C. Coagulation and fibrinolysis in thyroid dysfunction. *Endocrine* 2009; 35: 293-6.
 55. Erem C, Ersoz HO, Kartý SS, Ukinc K, Hacıhasanoglu A, Degçer O et al. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 345-50.
 56. Burggraaf J, Lalezari S, Emeis JJ, Vischer UM, de Meyer PH, Pijl H ET al. Endothelial function in patients with hyperthyroidism before and after treatment with propranolol and thiamazol. *Thyroid* 2001; 11, 153-60.
 57. Akinci B, Comlekci A, Yener S, Demir T, Ozcan MA, Bayraktar F, Yesil S. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor an-

tigen levels are inversely correlated with plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels in hyperthyroid patients. *Endocr J* 2007; 54: 593-9.

58. Chadarevian R, Bruckert E, Leenhardt L, Giral P, Ankri A, Turpin G. Components of the fibrinolytic system are differently altered in moderate and severe hypothyroidism. *Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 732-7.
59. Akinci B, Comlekci A, Ali Ozcan M, Demir T, Yener S, Demirkan F et al. Elevated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels in overt and subclinical hypothyroid patients were reduced by levothyroxine replacement. *Endocr J* 2007; 54: 45-52.
60. Erem C, Ucuncu O, Yilmaz M, Kocak M, Nuhoglu I, Ersoz HO. Increased thrombinactivatable fibrinolysis inhibitor and decreased tissue factor pathway inhibitor in patients with hypothyroidism. *Endocrine* 2009; 35: 75-80.

TROMBÓLISIS EN EL ICTUS ISQUÉMICO

J. ÁLVAREZ SABÍN

Servicio de Neurología.

Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Departamento de Medicina.

Universidad Autónoma de Barcelona

Introducción

El ictus isquémico es un proceso dinámico: si bien los síntomas y signos neurológicos aparecen de forma brusca tras una oclusión arterial, la lesión encefálica siempre tarda horas en desarrollarse; este periodo de tiempo, denominado ventana terapéutica, es la oportunidad que hay para salvar el tejido cerebral. Cuanto mayor es el tiempo en el que la arteria está ocluida, mayor es el tamaño del infarto cerebral¹. Pero también, cuanto más dura la oclusión, mayor es el riesgo de hemorragia post-reperfusión². El tratamiento trombolítico es capaz de frenar este proceso dinámico: el tPA incrementa en 5 veces la probabilidad de recanalización precoz (6 primeras horas). Ello conduce a infartos cerebrales de menor tamaño y a una mejor situación neurológica y funcional del paciente con ictus isquémico³.

Cuatro grandes estudios: ECASS-I (0-6 h), NINDS (0-3 h), ECASS-II (0-6 h) y ATLANTIS (3-5 h), publicados en los últimos 5 años del siglo pasado, condujeron a que en EE UU la FDA aprobase el tratamiento con tPA i.v. para el infarto cerebral de menos de 3 horas de evolución en el año 1996, y en Europa la EMEA recomendase la realización del registro SITS-MOST en el año 2002. La publicación, 5 años después, de los resultados de 6.483 pacientes incluidos en el registro SITS-MOST⁴ confirma la eficacia y seguridad en la práctica clínica diaria de la administración del tPA i.v. en las 3 primeras horas.

A pesar de la eficiencia del tratamiento con tPA, éste todavía se está administrando a tan sólo un pequeño porcentaje de pacientes con ictus isquémico (3-8,5% de los pacientes elegibles). Pero además, y según los criterios del registro SITS-MOST, muchos pacientes con ictus isquémicos quedan excluidos de este tratamiento (mayores de 80 años de edad, tiempo de evolución superior a 3 horas, ictus muy importantes por criterios clínicos (NIH > 25) y/o radiológicos, anticoagulados, con diabetes mellitus e ictus previo... Inclusive, solamente el 40-66% de los pacientes tratados con tPA i.v. en las 3 primeras horas en la actualidad alcanzan una repercusión eficaz y precoz.

Los retos actuales de la trombólisis en el ictus isquémico son:

- ¿Cómo hacerla accesible a un mayor número de ictus?
- ¿Cómo aumentar la eficacia?
- ¿Cómo extender la ventana terapéutica?

Cómo hacerla más accesible a más pacientes con ictus

El tratamiento trombolítico está limitado en la actualidad a un porcentaje pequeño de pacientes. Medidas que deben contribuir a aumentar su accesibilidad a un mayor número de personas son:

- Aquellas dirigidas a mejorar el conocimiento de la población y a planificar y coordinar la atención sanitaria a los pacientes con ictus, tales como el Programa de Atención Sanitaria al Ictus (PASI)⁵ y la Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud presentada en marzo de este año.
- La utilización de las nuevas tecnologías de imagen y comunicación (TIC), en concreto la telemedicina, puede ayudar a la extensión del uso de la trombólisis sistémica, manteniendo la calidad del tratamiento^{6,7}.
- El empleo de fibrinolíticos más fibrino-específicos y con una ventana terapéutica más amplia (*ver más adelante*).

Cómo aumentar la eficacia

Factores relacionados con la eficacia de la recanalización post-trombólisis

Conocemos varios de los factores relacionados con la eficacia de la recanalización arterial post-tratamiento con rt-PA i.v.:

- Las características del trombo, principalmente su composición y origen. El tPA i.v. tiene mayor eficacia para lisar los trombos rojos formados en zonas de estasis sanguínea como son las cavidades izquierdas del corazón.

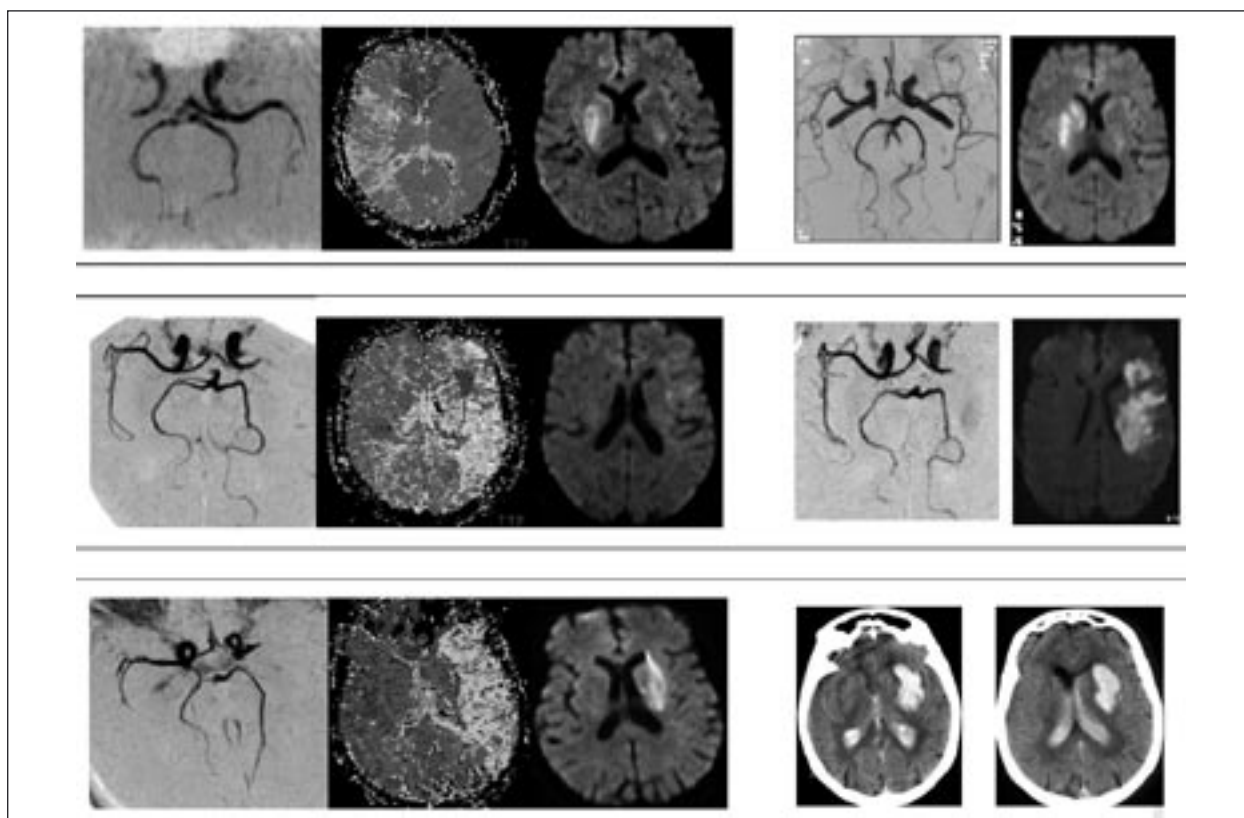


Figura 1. Diferentes respuestas al tratamiento fibrinolítico. Pacientes tratados con la misma dosis de tPA i.v. y con tiempo de evolución del ictus similar presentan diferentes respuestas: el primero, recanalización arterial y buena evolución; el segundo, persistencia de la oclusión arterial y crecimiento de la lesión cerebral, y el tercero, una transformación hemorrágica sintomática.

- El volumen y la localización del trombo. La eficacia de la fibrinólisis i.v. disminuye de forma muy evidente cuanto mayor es el calibre de la arteria cerebral ocluida.
- Etiología del ictus isquémico. La recanalización es más frecuente, rápida y completa en pacientes con ictus cardioembólicos comparada con otros subtipos etiológicos de ictus⁸.
- Velocidad para alcanzar la recanalización. La velocidad de la lisis del coágulo se relaciona con el tamaño de la lesión cerebral y la evolución clínica. El patrón de recanalización arterial súbito es el que se asocia con una mejor evolución⁹.
- Tipo (grado) de recanalización obtenida. La recanalización completa se relaciona con mejor situación funcional.
- Inhibidores endógenos de la fibrinólisis. El perfil de los inhibidores endógenos de la fibrinólisis predice la resistencia a la lisis del trombo tras tratamiento con tPA. Niveles bajos de PAI-1¹⁰ y altos de TAFI¹¹ se asocian con mayores porcentajes de recanalización precoz y mejor evolución funcional.
- Respuesta neuroinflamatoria. Tanto la MMP-9 como la MMP-13 son predictores independientes de crecimiento más extenso de la lesión en la difusión en las primeras 24 horas del ictus a pesar de la terapia

trombolítica¹². El efecto deletéreo de la MMP-9 obedece a su sobreexpresión *in situ*, en el parénquima encefálico, apoyando la contribución de la MMP-9 en la lesión cerebral isquémica y en el edema perihematoma¹³.

- Tratamiento previo al ictus. Los pacientes que están tomando estatinas previamente al tratamiento con tPA i.v. tienen 5 veces más probabilidades de presentar una situación de independencia funcional a los 3 meses¹⁴.

- Factores genéticos. Desconocemos la causa de que pacientes clínicamente idénticos respondan de forma tan diferente a esta terapia (Figura 1). Una de las posibles causas de esta respuesta tan dispar sería la variabilidad genotípica propia de cada individuo. Gracias al estudio Geno-tPA estamos empezando a conocer diversos polimorfismos que condicionan la respuesta al tratamiento trombolítico. Así, el genotipo DD del ACE es un predictor independiente de recanalización arterial post-tPA; los pacientes con el genotipo DD tienen 4 veces más probabilidades de recanalización¹⁵. El polimorfismo V34L del Fc XIII se asocia con mayor riesgo de transformación hemorrágica sintomática y unas tasas de mortalidad más altas tras la terapia trombolítica¹⁶.

- Glicemia. La hiperglucemia aguda, al disminuir la actividad fibrinolítica (aumento del PAI-1 y disminu-

ción de la actividad tPA plasmática), retrasa la reperusión de la penumbra isquémica en pacientes con ictus tratados con tPA. Valores de glicemia basal por encima de 140 mg/dL se asocian de forma independiente con mala evolución (Rankin modificado: 3-6) en estos pacientes (OR 5,65; IC 95%: 1,97-16,18), contrarrestando en gran parte el efecto beneficioso de la recanalización arterial¹⁷. El impacto de la glicemia basal en la evolución del ictus varía dependiendo del tiempo en el que se alcanza la reperusión inducida por tPA¹⁸. Así, el efecto deletéreo de la glicemia basal en el reclutamiento de penumbra isquémica hacia infarto es superior después de una reperusión precoz (< 3 horas) que en la retardada o en la no reperusión (OR 3,1, 1,1 y 0,7, respectivamente).

Sonotrombólisis

La trombólisis potenciada por ultrasonidos o sonotrombólisis consiste en la insonorización (2-MHz) de la arteria ocluida durante 2 horas tras la administración del bolus de tPA i.v. Se ha demostrado que incrementa de forma significativa ($p = 0,003$) el porcentaje de recanalización arterial completa y mejora la situación funcional de los pacientes a los 3 meses, sin incrementar el porcentaje de transformación hemorrágica sintomática¹⁹. Este efecto beneficioso de los ultrasonidos se alcanza a través de un proceso de microcavitación, el cual produce una disgregación reversible de la fibrina y facilita la penetración del tPA dentro del trombo.

Sonotrombólisis + microburbujas

Las microburbujas de gas (contrastes ecográficos) al pasar por el haz de ultrasonidos acaban explotando y liberando así una energía que facilita la penetración de tPA al centro del trombo. Un trabajo realizado en la Unidad Neurovascular Vall d'Hebron demuestra cómo la administración de 3 bolos de microburbujas durante la infusión de tPA acompañada de la insolación constante del trombo incrementa todavía más el beneficio sin incrementar el riesgo de transformación hemorrágica sintomática²⁰.

Combinación con antagonistas de la GP IIb/IIIa

Al igual que ocurre en el síndrome coronario agudo, la combinación de tPA más un inhibidor de la GPIIb/IIIa puede mejorar las tasas de recanalización arterial *versus* fibrinólisis sola. El estudio CLEAR²¹ ha demostrado la seguridad de dosis bajas de tPA (0,3-0,45 mg/kg) más eptifibatide en pacientes con ictus isquémico tra-

tados en las 3 primeras. El estudio CLEARER estudiará la seguridad y eficacia de dosis de 0,6 mg/kg rt-PA + eptifibatide *versus* rt-PA a dosis estándar.

Cómo extender la ventana terapéutica

El análisis conjunto de los estudios ECASS, ATLANTIS y NINDS demostraba que cuanto más precoz era el inicio del tratamiento fibrinolítico mejores resultados se obtienen, pero también sugería que el efecto beneficioso (evolución favorable a los 3 meses) del tPA i.v. podía extenderse hasta la 4,5 horas. Esta hipótesis ha sido corroborada por el estudio ECASS III²². Los pacientes con ictus isquémico de menos de 4,5 horas de evolución tratados con tPA i.v. tienen un 34% más de posibilidades de presentar a los 3 meses un Rankin de 0-1 que aquellos que recibieron placebo, a expensas de un incremento en el riesgo de HIC sintomática (2,4% *vs.* 0,2%) y una ligera disminución en la mortalidad (7,7% *vs.* 8,4%). Estos resultados son congruentes con los del SITS-ISTR (*Cerebrovasc Dis* 2008; 25: 3), que comparó la evolución de los pacientes del registro SITS-MOST tratados entre las 3 y 4,5 horas con los tratados dentro de las 3 primeras horas, sin encontrar diferencias en la evolución a los 3 meses, transformación hemorrágica sintomática ni mortalidad. Por lo tanto, el rtPA i.v. sigue siendo seguro y eficaz hasta las 4,5 horas.

Pero en la actualidad la ventana para la administración de tPA i.v. la podemos extender más allá: hasta las 6 horas. Para ello, es necesario demostrar la existencia de una oclusión arterial y de tejido cerebral potencialmente salvable (penumbra isquémica). Ello es factible en la práctica clínica diaria gracias al Doppler transcraneal y a la RM multimodal con secuencias de difusión (DF) y perfusión (PF). Precisamente utilizando dichas exploraciones complementarias en una serie de 122 pacientes con ictus isquémico tratados con tPA i.v. (79 de 0 a 3 horas y 43 de 3 a 6 horas) pudimos comprobar la eficacia y seguridad de la fibrinólisis i.v. guiada por Doppler transcraneal y DF-PF por RM en las 6 primeras horas del ictus isquémico, con unos porcentajes similares de recanalización, recuperación funcional y transformación hemorrágica sintomática que cuando se utiliza con ventanas de 3 horas²³. El análisis de los pacientes del registro alemán conjuntamente con los del ATLANTIS, ECASSS y NINDS²⁴ confirman nuestros resultados en el sentido de que es seguro y eficaz extender la fibrinólisis i.v. hasta las 6 horas en aquellos pacientes con tejido cerebral en riesgo evidenciado por RM.

Otro trabajo, realizado en la misma unidad, demuestra cómo la gran mayoría de las recanalizaciones inducidas por tPA ocurren durante la primera hora desde el inicio del tratamiento. La probabilidad

de recanalizar durante la segunda hora es sólo de un 16% y cae todavía más, a un 9%, en las 6 primeras horas. Es importante reseñar que los pacientes que recanalizan en las 2 o 6 primeras horas siguen teniendo una mejor evolución neurológica, significativa estadísticamente, que los pacientes que no recanalizan. Por ello, otras técnicas de reperfusión deben ser consideradas si el flujo no mejora en los 60 minutos después del bolus de tPA²⁵.

Procedimientos intraarteriales de rescate

La evidencia de que la fibrinólisis endovenosa no es suficiente en muchos casos ha provocado que desde hace unos años se estén adoptando estrategias terapéuticas que permitan mejorar las tasas de reperfusión. Los procedimientos intraarteriales (IA) en el tratamiento de la fase aguda del ictus pueden lograr la recanalización arterial en algunos casos refractarios al tratamiento con tPA i.v. y, por lo tanto, tienen un impacto positivo sobre el pronóstico.

El **tratamiento trombolítico combinado endovenoso/intraarterial** ya se utiliza en varios centros especializados. Sus beneficios radican en que permite iniciar rápidamente el tratamiento (endovenoso). Recordemos que en el ictus agudo “tiempo es cerebro”, y si no se observa recanalización tras 60 minutos se prosigue con procedimientos intraarteriales con los que mediante disrupción mecánica e infusión local de una dosis extra de t-PA se pretende ofrecer un tratamiento de rescate. La trombólisis combinada IV-IA guiada por Doppler transcraneal es eficaz y segura, con una evolución favorable a los 3 meses del 56% de los pacientes²⁶.

Trombectomía mecánica

La disrupción mecánica del trombo incrementa, de forma segura, las tasas de recanalización obtenidas por la fibrinólisis IA²⁷. Se han desarrollado diversos dispositivos para la realización de la trombectomía mecánica, como el Multi-MERCI, el cual aumenta de forma notable los porcentajes de recanalización arterial en oclusiones de muy escasa respuesta al tPA i.v., sin incrementar las complicaciones²⁸. Ya en el año 2004 la FDA aprobó el uso de catéteres para embolectomías en las arterias cerebrales en pacientes con ictus isquémico en los que está contraindicada la fibrinólisis i.v. o que no responden a la misma.

Nuevos fibrinolíticos

- **Desmoteplase:** Fibrinolítico con una afinidad superior a la fibrina y sin efecto excitotóxico. El estudio

DEDAS demostró cómo su administración por vía i.v. entre las 3 y 9 horas después del inicio de un ictus isquémico es segura; además, al utilizar dosis de 125 µg/kg había una tendencia a una mejoría en la evolución clínica de aquellos pacientes con tejido cerebral salvable en la RM cerebral²⁹. Sin embargo, un nuevo estudio en fase IIb (DIAS II), para replicar estos resultados, no demostró beneficio. En la actualidad está en marcha un nuevo estudio en fase III.

- **Tenecteplase (TNK):** Fibrinolítico fibrino selectivo con el que se alcanzan mayores porcentajes de recanalización y que tiene un menor riesgo hemorrágico. Estudio en fase II en marcha.

Terapia combinada: tPA + inhibidor metaloproteasas

La limitación de la fibrinólisis a las 3 horas está relacionada, en parte, con el incremento en el riesgo de edema cerebral y transformación hemorrágica con trombólisis retardada asociado con lesión de la barrera hematoencefálica. El tPA a través de una sobreexpresión de MMP-9 contribuye a la lesión de la barrera hematoencefálica. Por ello, un inhibidor de las MMP podría prevenir este efecto nocivo del tPA. En un estudio experimental la combinación de minociclina (un inhibidor de las MMP) y la administración de tPA a las 6 horas de la inducción de isquemia disminuye los niveles de MMP-9, reduce el infarto y disminuye el riesgo hemorrágico³⁰. Por lo tanto, la terapia combinada con minociclina puede extender la ventana temporal del tratamiento con tPA en el ictus isquémico.

Bibliografía

1. Arenillas JF, Rovira A, Molina C, Grivé E, Montaner J, Alvarez-Sabín J. Prediction of Early Neurological Deterioration using Diffusion and Perfusion Weighted Imaging in Hyperacute Middle Cerebral Artery Ischemic Stroke. *Stroke* 2002; 33: 2197-2205.
2. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32:1759-1766.
3. Molina C, Montaner J, Abilleira S, Romero F, Ibarra B, Arenillas JF, Alvarez Sabin J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 1079-1084.
4. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grund M, Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007; 369: 275-282.
5. Alvarez Sabín J, Alonso de Leciñana M, Gallego J, Gil Peralta A, Casado I, Castillo J, Díez Tejedor E, Gil A, Jiménez C, Lago A, Martínez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F. Plan de atención sanitaria al ictus. *Neurología* 2006; 21:717-726.
6. Audebert HJ, Kukla C, Vatankeh B, Gotzler B, Schenkel J, Hofer S, al. Comparison of tissue plasminogen activator ad-

- ministration management between Telestroke Network hospitals and academic stroke centers: The Telemedical Pilot Project for Integrative academic stroke centers. *Stroke* 2006; 37: 1822-1827).
7. Ribó M, Alvarez-Sabín J. ¿Puede la telemedicina restablecer la equidad geográfica en el tratamiento del ictus agudo?. *Rev Neurol* 2008; 46:557-560.
 8. Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Ribo M, Rubiera M, Alvarez-Sabin J. Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke*. 2004; 35: 486-90.
 9. Delgado-Mederos R, Rovira A, Alvarez-Sabín J, Ribó M, Munuera J, Rubiera M, Santamarina E, Maisterra O, Delgado P, Montaner J, Molina CA. Speed of tPA-induced clot lysis predicts DWI lesion evolution in acute stroke. *Stroke* 2007; 38:955-960.
 10. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabin J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 1146-1151.
 11. Montaner J, Ribó M, Monasterio J, Molina C, Alvarez-Sabín J. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 1038-1040.
 12. Rosell A, Alvarez-Sabin J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernandez-Cadenas I, Penalba A, Molina CA, Montaner J. A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation Between MMP-9 and MMP-13 With Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke. *Stroke* 2005; 36: 1415-1420.
 13. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Eng H. Lo, Montaner J. Increased brain expresión of Matrix Metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006; 37:1399-1406.
 14. Alvarez-Sabín J, Huertas R, Quintana M, Rubiera M, Delgado P, Ribo M, Molina CA, Montaner J. Prior statin use may be associated with improved outcome after rt-PA. *Stroke* 2007; 38: 1076-1078.
 15. Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Penalba A, Ortega-Torres L, Delgado P, Quintana M, Rosell A, Montaner J. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett*. 2006; 398: 167-71.
 16. Gonzalez-Conejero R, Fernandez-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabin J, Vicente V, Corral J, Montaner J. Role of Fibrinogen Levels and Factor XIII V34L Polymorphism in Thrombolytic Therapy in Stroke Patients. *Stroke* 2006; 37: 2288-2293.
 17. Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M. Serum glucose as a predictor of poor outcome in reperfused t-PA treated patients. *Stroke* 2003; 34: 1235-1241.
 18. Alvarez-Sabín J, Molina CA, Ribó M, Arenillas JF, Montaner J, Huertas R, Rubiera M, Santamarina E. Impact of acute hyperglycemia on stroke outcome after thrombolysis. Risk stratification in relation to time to reperfusion. *Stroke* 2004; 35: 2493-2498.
 19. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Ford SR, Garami Z, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Chernyshev OY, Moye LA, Hill MD, Wojner AW. A Multi-center Randomized Trial of Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute. *N Engl J Med* 2004; 351: 2170-2178.
 20. Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Huertas R, Purroy F, Delgado P, Alvarez-Sabín J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2006; 37: 425-429.
 21. Pancioli AM, Broderick J, Brott T, et al. The combined approach to lysis utilizing eptifibatid and rtPA in acute ischemic stroke. The CLEAR stroke trial. *Stroke* 2008; 39: 3268-3276.
 22. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-1329.
 23. Ribo M, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Romero F, Delgado P, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Molina CA. Temporal profile of recanalization after iv tPA, selecting patients for rescue reperfusion techniques. *Stroke* 2006; 37: 1000-1004.
 24. Thomalla G, Schwark C, Sobesky J, Bluhmki E, Fiebach JB, Fiehler J, et al. Outcome and symptomatic bleeding complications of intravenous thrombolysis within 6 hours in MRI-selected stroke patients. *Stroke* 2006; 37: 852-858.
 25. Ribo M, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Romero F, Delgado P, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Molina CA. Temporal profile of recanalization after iv tPA, selecting patients for rescue reperfusion techniques. *Stroke* 2006; 37:1000-1004.
 26. Sekoranja L, Loulidi J, Yilmaz H, Lovblad K, Temperli P, Comelli M, Sztajzel RE. Intravenous versus combined (intravenous and intra-arterial) thrombolysis in acute ischemic stroke. A transcranial color-coded Duplex sonography-guided pilot study. *Stroke* 2006; 37: 1805-1809.
 27. Noser EA, Shaltoni HM, Hall CE, Alexandrov AV, Garami , Cacayorin ED, Song JK, Grotta JC, Campbell MS. Aggressive mechanical clot disruption. A safe adjunct to thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke* 2005; 36: 292-296.
 28. Smith WS, Sung G, Saver J, , et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke. Final results of the Multi MERCI trial. *Stroke* 2008; 39: 1205-1212.
 29. Furlan AJ, Eydind D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, et al. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS). Evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 2006; 37: 1227-1231.
 30. Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extensión de the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke, *Stroke* 2008; 39: 3372-3377.

FIBRINOLISIS Y PROTEOLISIS: IMPLICACIONES E INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

J. ORBE, J.A. RODRÍGUEZ, J.A. PÁRAMO

Laboratorio de Aterosclerosis. Área de Ciencias Cardiovasculares. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica constituyen la principal causa de morbimortalidad en nuestro medio. Dentro de este grupo, los procesos trombóticos causados por la oclusión vascular por un coágulo de fibrina representan el principal mecanismo desencadenante de los eventos de mayor relevancia clínica, como el infarto agudo de miocardio (IAM) o el ictus isquémico (INE, 2007). Una alteración de los sistemas proteolíticos puede ser de capital importancia en la patogenia de estos procesos. Los dos sistemas proteolíticos que participan de forma más activa en la enfermedad cardiovascular son el sistema fibrinolítico y el de las metaloprotea-

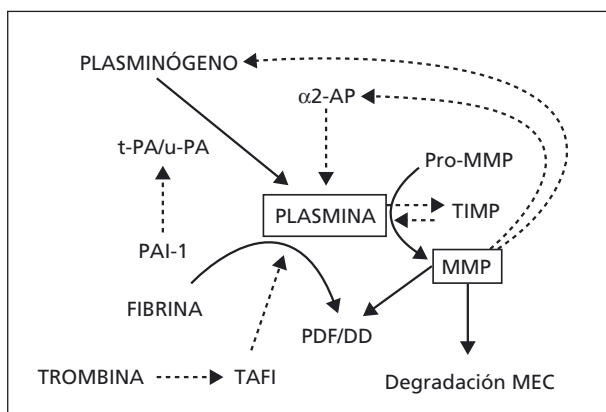


Figura 1. Interacciones entre los sistemas fibrinolítico/metaloproteasas. Líneas de trazo continuo: activación; líneas de trazo discontinuo: inhibición.

sas, los cuales cooperan para modular la integridad vascular (Figura 1).

Sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico, denominado también sistema plasminógeno/plasmina, es el encargado de la disolución en la fibrina intravascular manteniendo la fluidez circulatoria. Está compuesto por la proenzima inactiva plasminógeno, que se convierte en la enzima activa plasmina, encargada de degradar la fibrina insoluble en productos de degradación solubles. Se han descrito dos activadores fisiológicos del plasminógeno (AP): el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el tipo urocinasa (u-PA). La inhibición del sistema fibrinolítico tiene lugar a nivel de los AP, principalmente por el inhibidor específico del t-PA (PAI-1) o a través del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), y a nivel de la plasmina, principalmente por la α 2-antiplasmina (α 2-AP).

La activación del plasminógeno por el t-PA está implicada principalmente en la disolución de la fibrina circulante, mientras que el u-PA se une a su receptor en la superficie celular (u-PAR) para activar el plasminógeno unido a la célula, siendo su principal función la de activar la fibrinólisis durante el remodelado y la reparación tisular, función macrofágica, ovulación, embrioinplantación e invasión tumoral¹.

La regulación del sistema fibrinolítico está mediada por el control de la síntesis, secreción y aclaramiento de los activadores e inhibidores del plasminógeno y por las interacciones específicas entre sus componentes. Un desequilibrio en el sistema fibrinolítico por excesiva activación conlleva la aparición de hemorragias, mientras que una activación defectuosa favorece la tendencia trombótica.

Componentes del sistema fibrinolítico

- **El plasminógeno** es una glicoproteína de cadena simple de 92 KDa cuya concentración plasmática es de 200 μ g/mL. Su activación a plasmina se produce por la rotura del enlace peptídico Arg561-Val562, que da lugar a 2 cadenas, una pesada con los 5 dominios kringle, que contienen los lugares de unión de la lisina por los que esta proteína se une a la fibrina, y otra ligera, que contiene el dominio catalítico. El plasminógeno nativo es Glu-plasminógeno que, en el plasma, se convierte en Lys-plasminógeno, siendo éste el sustrato preferente de los AP. El plasminógeno se activa por el t-PA en dos fases: en la primera, el t-PA activa lentamente el plasminógeno sobre la superficie intacta de fibrina y, en la segunda, la fibrina parcialmente degradada expone lugares de unión adicionales y probablemente diferentes para el plasminógeno y el t-PA, incrementado de manera significativa su velocidad de activación.

- **El t-PA** es una serínproteasa de 70 kDa cuya concentración plasmática es de 5 ng/mL. Se produce en forma activa de cadena simple y, por acción de la plasmina, se convierte en la enzima de doble cadena también enzimáticamente activa. El t-PA actúa preferentemente sobre el plasminógeno en presencia de fibrina.

- **El u-PA** es una glicoproteína de 54 kDa producida también como cadena simple y convertida por la plasmina en enzima de doble cadena. Su concentración plasmática es de 2 ng/mL. A diferencia del t-PA, el u-PA no contiene lugares de unión de la lisina, por lo que no se puede unir directamente a la fibrina. La activación del plasminógeno por u-PA se produce principalmente en la superficie celular, ya que la unión a su receptor (u-PAR) favorece la generación de plasmina.

- **La α 2 antiplasmina (α 2-AP)** es una glicoproteína que contiene un 13% de carbohidratos y que se encuentra en el plasma a una concentración de 70 μ g/mL. Es una serpina con numerosos residuos lisina que contribuyen a su unión con la plasmina, siendo su principal inhibidor fisiológico. La α 2-AP se une a la plasmina libre formando un complejo plasmina- α 2-AP (PAP), que puede ser detectado en la circulación en determinados estados patológicos. Este inhibidor también se une al coágulo de fibrina en presencia de Ca^{+2} y FXIIIa.

- **El PAI-1** es una serpina de 52 kDa que rápidamente se inactiva, salvo que sea estabilizada por la proteína S o por la vitronectina. Su concentración en el plasma es de 20 ng/mL y es el principal inhibidor del t-PA y u-PA. Tiene una gran eficiencia inhibiendo al t-PA en el plasma, y su concentración se eleva rápidamente en diferentes patologías (trombosis, cáncer, enfermedad hepática, etc.).

- **El TAFI** es una carboxipeptidasa de 60 kDa que se convierte en la enzima activa por la rotura del enla-

ce peptídico Arg92-Arg93. Su concentración plasmática es de 5 µg/mL. Sus principales activadores son el complejo trombina/trombomodulina y la plasmina. El TAFI actúa rompiendo los residuos lisina carboxiterminales de la fibrina parcialmente degradada inhibiendo la unión del plasminógeno a la fibrina. Además, inhibe la conversión del Glu-plasminógeno a Lys-plasminógeno y reduce la inhibición de la plasmina por α 2-AP. El TAFI también elimina los residuos de lisina carboxiterminales de los receptores celulares del plasminógeno e inhibe los procesos de migración *in vivo* y angiogénesis *in vitro*².

Sistema de metaloproteasas: interacciones con el sistema fibrinolítico

Las metaloproteasas (MMP) son una familia de proteínas dependientes de zinc y calcio que se secretan en forma de zimógenos, que pueden ser activadas por otras proteasas y por plasmina. En general, contienen un dominio catalítico con residuos de histidina e iones zinc y un dominio regulador (pro-peptido), responsable de la forma latente o inactiva por unión de una cisteína al centro activo, que al escindir se activa la enzima. Sobre esta unidad básica se añade un número variable de dominios estructurales (hemopexina, fibronectina, etc.), que les confieren especificidad por el sustrato, regulan la unión a proteínas de matriz extracelular (MEC) y determinan la interacción con los inhibidores de metaloproteasas (TIMP). Aunque la mayoría de estas enzimas son secretadas, existe también un grupo de MMP unidas a membrana por dominios intracitoplasmáticos y transmembrana (MT-MMP)³. Estudios de cristalografía han puesto de manifiesto que el dominio catalítico de todas las MMP tiene una topología diferente del lugar activo, lo que da lugar a diferencias en la especificidad por los sustratos. Las cuatro subclases de MMP que participan más activamente en la degradación de MEC son: colagenasas (MMP-1, MMP-8), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) y las metaloproteasas asociadas a membrana (MT-MMP)⁴.

La principal función de las MMP es degradar los componentes de la MEC. En condiciones fisiológicas, contribuyen al remodelado tisular y al ciclo menstrual y participan en los procesos de reparación de tejidos³. En los últimos años se ha descrito que existe una estrecha cooperación entre el sistema fibrinolítico y el de las MMP a distintos niveles, lo que sugiere que ambos sistemas pueden cooperar en la actividad proteolítica, aunque su relevancia fisiológica aún no se ha establecido (Figura 1). A nivel patológico juegan un papel relevante en la aterosclerosis, la angiogénesis y el cáncer. Datos obtenidos de animales deficientes en MMP

o en componentes del sistema fibrinolítico indican que la activación *in vivo* de algunas MMP ocurre por mecanismos dependientes del sistema plasminógeno/plasmina, pero también han demostrado que existen rutas alternativas al sistema plasminógeno/plasmina para la degradación de la fibrina^{5,6}. Asimismo, estudios celulares demuestran que las MMP pueden reducir la actividad plasmina asociada a la superficie celular, a través de la disminución de la cantidad de plasminógeno y por hidrólisis de los inhibidores de la fibrinólisis (α 2-macroglobulina y PAI-1)⁷.

Se han asociado cambios en la expresión de MMP o inhibidores con enfermedad arterial coronaria y con trombosis, siendo numerosos los estudios que encuentran que existe una asociación entre los niveles de MMP y la presencia de estas patologías o sus factores de riesgo. Además, nuestro grupo y otros han descrito otras funciones, como la capacidad de las MMP para degradar el fibrinógeno y la fibrina⁸, así como su participación en los fenómenos hemorrágicos tras tratamiento fibrinolítico^{9,10}. Sin embargo, no se ha establecido con precisión el papel de las MMP en la formación y en la lisis de fibrina, ni sus posibles efectos secundarios sobre la hemostasia o toxicidad celular.

La metaloproteasa-10 (MMP-10) o estromelisinina-2: ¿nuevo agente profibrinolítico?

En los últimos años nuestro grupo ha explorado el papel de una metaloproteasa, la MMP-10, en la fisiopatología de la aterotrombosis. La MMP-10 o estromelisinina-2 es una endopeptidasa que se localiza en el cromosoma 11 y es expresada por diversos tipos celulares como las células endoteliales, monocitos, fibroblastos, etc. Puede ser activada por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G, y degrada un amplio rango de sustratos de la MEC (elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina-C, vitronectina y colágeno tipo II, III, IV, IX, X, XI). Además, la MMP-10 puede activar otras MMP, como la proMMP-1, -3, -7, -8 y -9¹¹.

Se ha demostrado que la MMP-10 participa en diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento óseo o la cicatrización de heridas. Además, se halla sobreexpresada en córneas de pacientes con retinopatía diabética y se ha relacionado con algunos tipos de carcinomas (cabeza, esófago y pulmón), así como con tumores linfoides. Diversos estudios *in vitro* demuestran que la expresión de MMP-10 puede inducirse tanto por factores de crecimiento como por citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β). Recientemente se ha descrito que participa en la regresión de la formación de capilares mediante la activación de la MMP-1 y que es importante para la integridad vascular.

En nuestro grupo hemos demostrado que esta proteasa se induce por estímulos inflamatorios y protrombóticos^{11,12}, se localiza en placas ateroscleróticas avanzadas en lugares de rotura inminente y está elevada en pacientes ateroscleróticos¹³ o con niveles elevados de trombina¹⁴, lo que sugiere que puede estar implicada en el proceso aterotrombótico. Además, hemos demostrado que la MMP-10 altera la formación y lisis de coágulos actuando sobre proteínas de la coagulación/fibrinólisis, de modo que favorece la lisis del coágulo inducida por t-PA. Estudios *in vivo*, en ratones *knockout* para la MMP-10 (MMP10^{-/-}) confirmaron que la ausencia de MMP-10 reducía significativamente el tiempo de hemorragia sin alterar el número de plaquetas y, en un modelo de isquemia cerebral¹⁵, hemos observado que los ratones MMP10^{-/-} con trombosis en la arteria cerebral media reperfundían peor que los animales WT. Todo ello sugiere que existe *in vivo* un mecanismo dependiente de la MMP-10 que favorece la lisis del coágulo en este modelo de ictus. Finalmente, nuestros resultados sugieren que el efecto profibrinolítico de la MMP-10 está mediado por la inactivación del TAFI *in vitro* e *in vivo*, confirmando las interrelaciones proteolisis/fibrinólisis (Figura 1).

Por tanto, la MMP-10, por sus propiedades profibrinolíticas, podría constituir un nuevo agente en la terapia trombolítica. Serán necesarios estudios futuros que confirmen el papel de la MMP-10 en el diagnóstico de la enfermedad aterotrombótica y su uso terapéutico, así como el empleo de inhibidores selectivos como nueva estrategia antifibrinolítica.

Pruebas fibrinolíticas

Globales

Entre los ensayos globales clásicos para evaluar la capacidad fibrinolítica del plasma destacan el tromboelastograma, el tiempo de lisis de euglobulinas y la placa de fibrina. Estos métodos estudian todos los factores que juegan un papel decisivo en este sistema, pero no analizan su concentración ni su actividad aisladamente. El tromboelastógrafo determina en sangre el tiempo que tarda en formarse el coágulo, el tipo de coágulo formado y su capacidad de lisis¹⁶. Se emplea para determinar coagulopatías en pacientes con cirugía de alto riesgo hemorrágico y transfusión masiva, así como para la monitorización de la antifibrinólisis. Además, diversos estudios indican que podría emplearse para determinar estados hipercoagulables, fibrinólisis y actividad del factor XIII, aunque su uso no está validado. El tiempo de lisis de euglobulinas monitoriza la formación y lisis del coágulo de fibrina sobre la fracción euglobulínica del plasma, siendo útil para diferenciar la fibrinólisis primaria de

la coagulación intravascular diseminada (CID) y también se puede emplear para controlar terapias trombolíticas en pacientes con IAM, si bien son pruebas no empleadas de manera rutinaria por su laboriosidad y tiempo en obtener resultados. Finalmente, la placa de fibrina permite medir la capacidad fibrinolítica del plasma en función del área de lisis que produce una muestra sobre fibrina polimerizada¹⁷. Todas estas pruebas pueden ser útiles para diagnosticar el estado fibrinolítico, si bien no se realizan de forma rutinaria en los laboratorios de hemostasia.

Específicas

PDF y dímero D se determinan con pruebas inmunológicas, para valorar los productos de degradación de la fibrina (PDF y DD), que aumentan en sangre en estados de hiperfibrinólisis.

El dímero D es el producto de la digestión por plasma de la fibrina polimerizada. Los ensayos disponibles se basan en anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítopes y tanto el formato y los calibradores como la instrumentación varían de unos laboratorios a otros. Los primeros ensayos de dímero D se realizaban con bolas de látex cubiertas con un anticuerpo contra la región de unión de la fibrina al FXIII. Estos ensayos eran poco sensibles y requerían de personal especializado para medir la aglutinación. Seguidamente se desarrollaron nuevos métodos de aglutinación automáticos con partículas recubiertas de anticuerpo que se agregan en presencia de dímero D, pero se trata de métodos semicuantitativos, ya que la especificidad de los anticuerpos varía frente a los distintos fragmentos de degradación de la fibrina. Finalmente, se desarrollaron los ELISA, que son muy sensibles, pero requieren más tiempo de realización, aunque actualmente están automatizados. En la práctica, el dímero D se emplea para descartar tromboembolismo venoso (valor predictivo negativo > 90%) así como para el diagnóstico y monitorización de la activación de la coagulación en la CID. Recientemente se ha propuesto su utilidad en la predicción de recurrencia de TEV¹⁸.

α 2-AP

La α 2-AP es el inhibidor fisiológico más importante de la plasmina. Su determinación es útil en la evaluación de la hiperfibrinólisis, monitorización de la terapia trombolítica, diagnóstico de defecto de síntesis por daño hepático o defecto congénito y evaluación de episodios hemorrágicos debidos a déficit de α 2-AP. Los métodos empleados son cromogénicos, inmunológicos (electroforesis de Laurell o inmunonefelo-

metría) y ELISA empleando plasma citratado pobre en plaquetas.

Plasminógeno

El plasminógeno es el zimógeno que se convierte a su forma activa, la plasmina, por los activadores del plasminógeno. Se han reportado varios casos de trombosis en individuos con hipoplasminogenemia o con alteraciones estructurales en la molécula de plasminógeno. Existen técnicas para determinar tanto el plasminógeno funcional (sustratos cromogénicos) como el antigénico (ELISA), y su uso clínico está considerado únicamente para la detección de sujetos con hipoplasminogenemia.

t-PA

El t-PA es la enzima encargada de convertir el proenzima plasminógeno en la enzima activa plasmina que se encarga de degradar la fibrina. Se ha descrito en algunos estudios una correlación entre actividad t-PA y tendencia trombótica y se ha asociado con la progresión de enfermedad hepática. También se han observado niveles elevados de t-PA en retinopatía en diabetes tipo I y en trasplante cardiaco. Se pueden determinar tanto los niveles antigénicos como los de actividad en muestras de plasma humano. Los ensayos de actividad emplean como tapizado anticuerpos anti-PAI-1 o anticuerpos anti-t-PA que fijan el t-PA activo y se revelarán con un sustrato específico de la plasmina. Los ensayos para determinar el t-PA antigénico se basan en "ELISA sandwich" convencionales con 2 anticuerpos anti-t-PA, uno de ellos marcado con peroxidasa y revelado con sustrato de la peroxidasa.

PAI-1

El PAI-1 es el principal inhibidor de los activadores del plasminógeno. Se han asociado niveles elevados de PAI-1 con patología trombótica, progresión aterosclerótica y restenosis coronaria, pero su papel predictor de enfermedad coronaria arterial aún está en debate. Se ha demostrado su eficacia como marcador pronóstico del cáncer de mama e incluso como predictor de respuesta a terapia. A nivel clínico su determinación es útil para el diagnóstico del déficit de PAI-1, que se manifiesta con hemorragia, aunque los test actuales no son muy sensibles para niveles bajos. Los ensayos disponibles para medir PAI-1 son funcionales y antigénicos. En el primer caso, se atrapa el PAI-1 activo mediante la inmovilización de t-PA activo en la placa y se detectará posteriormente

con un secundario anti-PAI-1 marcado con peroxidasa; en el segundo caso, se trata de ELISA sandwich que reconocen todas las formas de PAI-1, activo, latente y sustrato.

TAFI

El TAFI es una carboxidasa con efecto antifibrinolítico. Existen diversos estudios sobre la asociación de los niveles de TAFI con la trombosis arterial, y las conclusiones a las que llegan son contradictorias. Se ha asociado un incremento de TAFI con aumento de riesgo de ictus, así como con diversos tipos de ictus isquémico. Otros estudios indican que no existe una relación clara entre los niveles de TAFI y la enfermedad arterial coronaria y, por último, un estudio reciente en IAM indica que son los niveles bajos de actividad TAFI los que se asocian con un mayor riesgo de infarto. A nivel clínico, más que su posible determinación para el diagnóstico se baraja su empleo en el tratamiento antifibrinolítico para evitar hemorragias o el empleo de inhibidores del TAFI en la terapia trombolítica para incrementar la eficiencia del t-PA. Existen métodos diferentes de medir el TAFI: el antigénico con técnica de ELISA con distintos anticuerpos frente a diferentes regiones de la proteína e incluso frente al péptido de activación, y el funcional, ensayo cromogénico en el que el TAFI inactivo se transforma en enzima activa con un reactivo que contiene trombina/trombomodulina que reacciona con un sustrato produciendo color detectado a 405 nm. Algunos de los ensayos de ELISA se ha demostrado que son dependientes de polimorfismos del TAFI, por lo que los estudios epidemiológicos documentados deben ser interpretados con precaución (Tabla 1).

Pruebas para metaloproteasas

Globales

Se han determinado los niveles de MMP y TIMP en diversas patologías como enfermedad arterial, cáncer y metástasis, angiogénesis, enfermedades inflamatorias, etc. Diversos estudios han demostrado que las MMP participan en la fisiopatología vascular y pueden contribuir a la progresión y ruptura de la placa de ateroma, así como a la expansión de los aneurismas arteriales, e intervienen en otros procesos numerosos en los que participan la ruptura de la lámina basal y la inflamación como artrosis, o la isquemia cerebral³. Sin embargo, no se ha establecido aún su uso clínico en el diagnóstico, tratamiento o prevención de estas patologías.

Tabla 1. Evaluación de los sistemas fibrinolisis/metaloproteasas

<i>Fibrinolisis</i>	
Pruebas globales	Pruebas específicas*
Tiempo de lisis de euglobulinas Plasma citrato	Dímero D (aglutinación, ELISA)
Tromboelastograma Sangre total, plasma	α 2 antiplasmina (funcional, cromogénico, inmunoquímicos)
Placa de fibrina Plasma citrato	Plasminógeno (antigénico y funcional)
	t-PA (Antigénico y funcional)
	Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)
	TAFI (antigénico y funcional)
<i>Metaloproteasas</i>	
Sustratos cromogénicos Plasma, suero	ELISAS antigénicos (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, TIMP-1, -2, -3 y -4) Plasma y/o suero
Zimografía Plasma, suero	ELISAS actividad (MMP-1, -2, -3, -9 y -13) Plasma y/o suero
Zimografía reversa Plasma, suero	

* Todas se realizan con plasma citratado

Sustratos cromogénicos

Las MMP se pueden medir de manera global mediante sustratos cromogénicos, que son pequeñas moléculas que se hidrolizan rápidamente por MMP. Dependiendo del sustrato tienen una especificidad distinta, aunque no existen sustratos específicos para una sola MMP.

Zimografía

Se emplean para determinar la actividad proteolítica circulante del plasma o suero¹⁹. Para ello se utilizan geles de acrilamida con un porcentaje del sustrato para las MMP de interés (gelatina, caseína). Tras la electroforesis e incubación, las MMP activas, separadas según su peso molecular, digieren el sustrato, pudiéndose determinar su actividad proteolítica midiendo el área de lisis.

Zimografía reversa

La técnica de zimografía reversa permite disponer de un método alternativo de detección de los TIMP. Como en el caso anterior, se utilizan geles de acrilamida polimerizados con un porcentaje de gelatina y MMP-2 o MMP-9. Tras la electroforesis e incubación, la metaloproteasa digiere todo el gel, excepto aquellas zonas en las que se localizan los TIMP o los com-

plejos MMP/TIMP, que se pueden medir tras la tinción del gel.

Específicas

Para determinar los niveles antigénicos de MMP, se emplea la técnica de ELISA sandwich, no de forma rutinaria en la clínica, si bien los estudios actuales indican que puede aportar información adicional sobre el grado de inflamación, progresión o severidad en algunas patologías. Existen ELISA específicos para cada una de las MMP así como sus inhibidores. Incluso se pueden realizar arrays de MMP sobre plasma y suero mediante ELISA sandwich multiplex que permiten cuantificar hasta 13 de estas proteínas o sus inhibidores simultáneamente.

Además, existen ensayos de actividad específicos para algunas metaloproteasas. En estos ensayos emplean un anticuerpo específico para la MMP que fijan a la placa, de forma que al añadir la muestra se une la MMP al anticuerpo y puede detectarse su actividad con un sustrato genérico de MMP detectable por colorimetría o fluorescencia.

Conclusiones

Existen numerosas interrelaciones entre el sistema fibrinolítico y el proteolítico que confirman su relevante papel en procesos fisiológicos y patológicos,

como la aterosclerosis y el cáncer. Es posible la determinación de las proteínas que componen ambos sistemas con pruebas de laboratorio globales y específicas. Se precisan estudios clínicos que confirmen el valor diagnóstico de cada prueba, de modo que su incorporación al laboratorio permita un diagnóstico precoz y más preciso de la enfermedad vascular y establecer su valor en la monitorización del tratamiento.

Bibliografía

- Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009;7:4-13.
- Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:226-36.
- Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:959-67.
- García-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1119-27.
- Lijnen HR, Silence J, Lemmens G, Frederix L, Collen D. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* 1998;79:1171-76.
- Arza B, Hoylaerts MF, Féliz J, Collen D, Lijnen HR. Prostromelysin-1 (proMMP-3) stimulates plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem.* 2000;267:6378-84.
- Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 2004;103:955-62.
- Bini A, et al. Characterization of MMP-3, MMP-7, and MT1-MMP derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer. *Biochemistry* 1999;38:13928-36.
- Kang SS, Kook JH, Hwang S, Park SH, Nam SC, Kim JK. Inhibition of MMP-9 attenuated neural progenitor cell migration after photothrombotic ischemia. *Brain Res* 2008;1228:20-6.
- Konstantino Y, et al. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease. *Biomarkers* 2009;14:118-29.
- Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, Díez J, Libby P, Páramo JA. C-reactive protein induces MMP-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1369-78.
- Rodríguez JA, Orbe J, Martínez de Lizarrondo S, Calvayrac O, Rodríguez C, Martínez-González J, Páramo JA. Metalloproteases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci* 2008;13:2916-21.
- Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of MMP-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007;5:91-7.
- Orbe J, Zudaire M, Serrano R, Coma-Canella I, Martínez de Sarrondo S, Rodríguez JA, Páramo JA. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the thrombin generation test. *Thromb Haemost* 2008;99:382-7.

- Orset C, et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 2007;38:2771-8.
- Traverso CI, Caprini JA, Arcelus JI. The normal thromboelastogram and its interpretation. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21:7-13.
- Vinazzer H. Basics and practice in evaluating plasminogen. *Haemostasis.* 1988;181:41-5.
- Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009;113:2878-87.
- Catterall JB, Cawston TE. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors: bioassays and immunoassays applicable to cell culture medium, serum, and synovial fluid. *Methods Mol Biol.* 2003;225:353-64.

IMPORTANCIA DE LA ESTRUCTURA DE LA FIBRINA EN SU LISABILIDAD: ESTUDIO EN DISTINTAS SITUACIONES PATOLÓGICAS

A.M. LAURICELLA, D.N. DE PARIS, A. ARÍN, G. ROSA

*Laboratorio de Hemostasia y Trombosis.
Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires (Argentina)*

La fibrina es una malla proteica resultante de la polimerización del fibrinógeno (Fbg) que constituye el soporte del tapón hemostático. La fibrina es el sustrato de la plasmina en la reacción lítica. Por lo tanto, su estructura y demás características son determinantes en la velocidad de su disolución. Estas características pueden variar en diferentes situaciones fisiológicas, como también en numerosos estados patológicos.

La lisabilidad de la fibrina evalúa cuánto demora la degradación del polímero por el sistema plasminógeno-plasmina ante condiciones controladas.

Además, la fibrina juega una importante función de cofactor, modulando la acción de la trombina, la activación del plasminógeno, la actividad de plasmina, t-PA, α_2 AP y factor XIII dentro del coágulo.

En la molécula de fibrinógeno existen sitios de unión a proteínas del sistema de coagulación (trombina, F XIII), y a proteínas fibrinolíticas (α_2 -antiplasmina, plasminógeno, t-PA)¹.

La activación de plasminógeno (Plg) por t-PA aumenta 1.000 veces en presencia de fibrina. Los sitios de unión para estas proteínas están ocultos en el Fbg y dispuestos de tal manera que el t-PA no puede activar el Plg. Cambios conformacionales posteriores a la fibrinoformación exponen estos sitios favoreciendo la activación del Plg y circunscribiendo la actividad lítica al lugar donde se encuentra el coágulo sanguíneo².

Caracterización de la fibrina

La fibrina puede ser caracterizada por diferentes propiedades, importantes para la detección de alteraciones. Las propiedades más estudiadas son la evaluación cinética de formación de la fibrina, la estructura, permeabilidad, viscoelasticidad y compactabilidad, entre otras.

La cinética de fibrinoformación puede estudiarse determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo. Las curvas resultantes son caracterizadas mediante: la fase de latencia (que corresponde al tiempo de inicio de la coagulación); la pendiente (que representa la velocidad de fibrinoformación) y la densidad óptica máxima ($DO_{m\acute{a}x}$) (asociada a la estructura final de la fibrina).

La estructura de la fibrina generalmente es evaluada por microscopía electrónica de barrido (MEB) (Figura 1) o por microscopía confocal (Figura 2)³. En nuestro laboratorio se utiliza también la microscopía de campo oscuro para evaluar la estructura de redes de fibrina (Figura 3). Esta metodología permite visualizar la fibrina sin tratamiento alguno, evitando cualquier modificación debida a la técnica. Además, como la muestra es iluminada con una fuente de baja potencia, se minimizan alteraciones del gel como contracción o deshidratación. La microscopía de campo oscuro ha resultado ser una técnica rápida, accesible y adecuada para detectar alteraciones estructurales en la fibrina de pacientes de diversas patologías.

La fibrina puede presentar estructuras muy variadas (Figura 1). La arquitectura global puede ser homogénea (ya sea compacta o abierta) o heterogénea (si posee poros o nudos)⁴. Puede cuantificarse el número de ramificaciones por área, el grosor de las fibras y la longitud entre ramificaciones. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras delgadas, muy ramificadas, mientras que una estructura abierta generalmente se vincula con fibras gruesas⁵.

El grado de entrecruzamiento de la fibrina por factor XIIIa puede evaluarse utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS).

La permeabilidad de la fibrina se estudia midiendo el flujo de fluido a través del gel. Se evalúa principalmente a través del coeficiente de permeabilidad específica (K_s), cuyo valor aumenta cuanto más permeable es el gel. La relación masa/largo de las fibras (μ) (calculado a partir de K_s y mediciones turbidimétricas) es proporcional a la $DO_{m\acute{a}x}$ y su aumento indica que la fibrina posee una arquitectura abierta, formada por fibras más gruesas³.

Las propiedades viscoelásticas, cuantificadas por estudios reométricos, evalúan la consistencia de la fibrina, principalmente a través del módulo elástico (G' ,

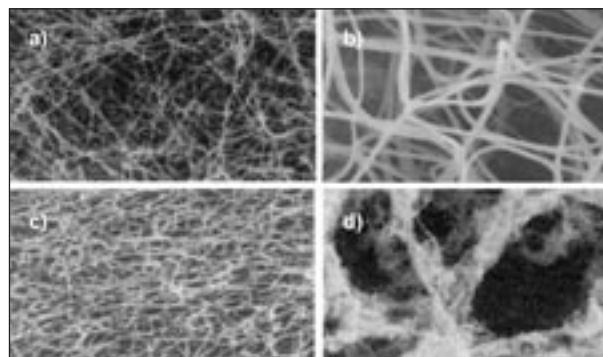


Figura 1. Arquitectura global de las redes de fibrina: a) homogénea; b) homogénea abierta, formada por fibras gruesas; c) homogénea compacta; d) heterogénea compacta con grandes poros.

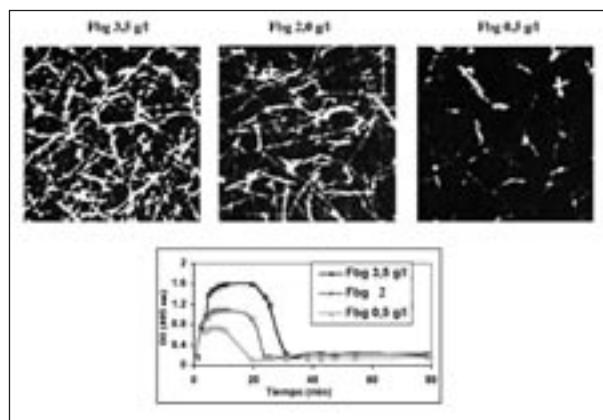


Figura 2. Efecto de la concentración de fibrinógeno sobre la estructura y la cinética de formación-lisis de la fibrina, en una etapa.

asociado a la dureza y rigidez del material) y del módulo viscoso (G'' , vinculado con la deformabilidad y la viscosidad del componente fluido)⁵. Estos parámetros evalúan la respuesta del material a pequeñas deformaciones, sin alterar su estructura, mientras que la compactabilidad cuantifica el colapso de las fibras ante grandes deformaciones.

Para evaluar la lisis se utilizan dos sistemas diferentes: uno en una sola etapa (o fibrinolisis intrínseca), donde los sistemas de formación y lisis de la fibrina se activan simultáneamente (aunque con distinta cinética) de modo que ambos procesos son evaluados en forma conjunta, mientras que el sistema en dos etapas (por difusión o permeación de los agentes líticos) permite evaluar separadamente ambos procesos. Pueden utilizarse diferentes métodos: densitométrico cinético o por un sistema de perfusión, percolando activadores de Plg y cuantificando productos líticos, como dímero D y productos de degradación de la fibrina, en el

eluyente. Los cambios morfológicos que se producen durante la fibrinólisis intrínseca son similares a los observados en dos etapas⁶.

Factores que influyen en las propiedades de la fibrina

La concentración de fibrinógeno en plasma normal fluctúa en un estrecho rango (2-4 g/L); no obstante, estas pequeñas variaciones modifican la estructura de la fibrina. Al aumentar la concentración de Fbg, la fibrina resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de lisar (Figura 2)⁸. La situación *in vivo* es más compleja aún, ya que la concentración de Fbg en el entorno de la fibri- noformación es muy diferente a la que se encuentra en circulación.

Variaciones en la estructura del Fbg, incluso sus variantes naturales, pueden producir cambios pronunciados en la fibrina resultante.

La molécula de Fbg puede presentar anomalías congénitas o adquiridas, que alteran su funcionalidad provocando desórdenes de la coagulación y generalmente conducen a redes de fibrina con alteraciones estructurales y/o funcionales. El 40% de las disfibrinogenemias congénitas detectadas no presentan alteraciones clínicas, mientras que el resto puede manifestarse por trastornos hemorrágicos, trombóticos, a veces ambos en el mismo paciente, abortos espontáneos o cicatrización defectuosa. Se ha propuesto una clasificación de las diferentes estructuras en base a las fibrinas obtenidas a partir de 38 disfibrinogenemias hereditarias⁷, que fueron agrupadas en base a la combinación de sus propiedades: redes semejantes a las normales, heterogéneas con poros o nudos, y con distinto grado de ramificación y porosi-

dad. Los estudios de las disfibrinogenemias han permitido explicar la relación estructura-función de los distintos aminoácidos del Fbg y cómo influye en la fibrina resultante.

El aumento de la fuerza iónica produce fibrina de estructura más ramificada y compacta, de mayor turbidez y rigidez, de porosidad marcadamente disminuida que la fibrina obtenida a menor fuerza iónica⁸. Los cationes divalentes tienen una importancia relevante en la estructura de la fibrina. En concentraciones fisiológicas, el Fbg posee los sitios de unión a calcio de alta afinidad ocupados, mientras que los de baja afinidad (como los residuos del ácido siálico) tienen función regulatoria. El calcio mantiene la estructura y estabilidad del Fbg. Además, aumenta el grosor de las fibras, la rigidez y resistencia mecánica de los geles de fibrina.

La concentración de trombina ejerce un efecto complejo sobre la fibrina (Figura 4A). Al aumentar la concentración de trombina, la fibrina incrementa su ramificación y densidad de fibras, mientras disminuye su porosidad. Pero a concentraciones mayores aun, se produce el efecto contrario. Además, está reportado que concentraciones de trombina crecientes (de entre 0,05 y 2 U/mL) generan fibras de menor diámetro. Las mayores variaciones de la fibrina *in vivo* son posiblemente causadas por la concentración de trombina, debido a los mecanismos fisiológicos complejos que controlan y regulan su actividad.

La actividad del factor XIII influye drásticamente en propiedades de la fibrina, principalmente en las viscoelásticas, la permeabilidad y su susceptibilidad a la lisis, si bien su efecto sobre la estructura es controvertido. Se ha reportado que los coágulos entrecruzados presentaron valores de G' cinco veces mayores que los no entrecruzados, indicando un pronunciado aumento de su dureza⁹.

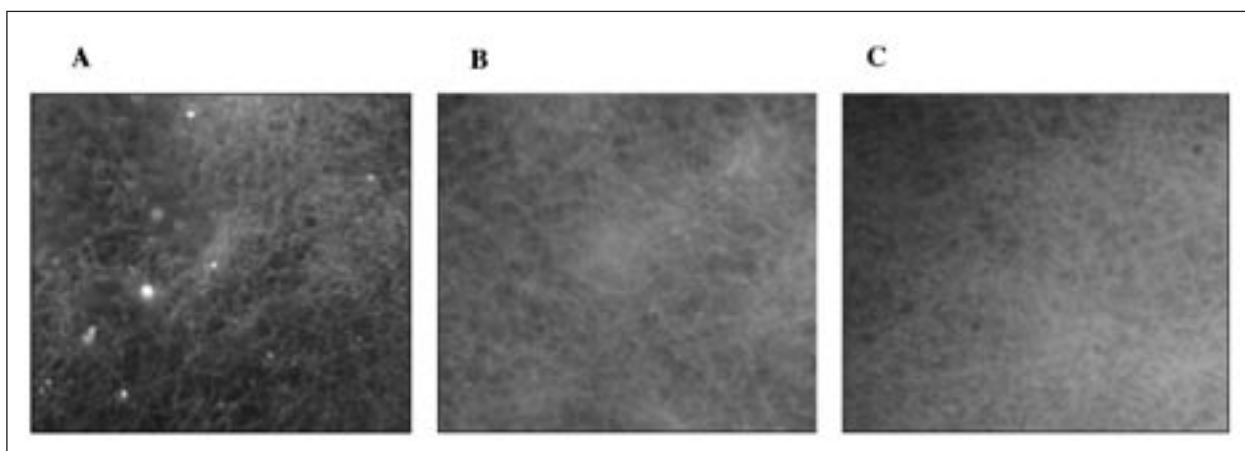


Figura 3. Redes de fibrina plasmática obtenidas con trombina (conc. final: 0,05 U/mL) por microscopía de campo oscuro de: A) individuo normal; B) paciente diabético; C) paciente con mieloma múltiple.

Influencia de la estructura de la fibrina en su lisabilidad

La velocidad de fibrinólisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina. La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que dentro del mismo gel las fibras delgadas se lisan antes que las gruesas. Las redes de estructura abiertas se lisan más rápidamente que las compactas a causa de la reducida cantidad de fibras por unidad de volumen y la movilidad facilitada de componentes fibrinolíticos^{5,10}.

La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg también depende de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor^{11,5}.

La permeabilidad de la fibrina es un factor decisivo en la velocidad de lisis. El transporte de plasminógeno y sus activadores por permeación a través del coágulo aumentó la velocidad de lisis aproximadamente 100 veces comparado con el transporte por difusión¹². Además, se documentó un marcado aumento de la fibrinólisis (más de 10 veces) al incrementar la velocidad de permeación de los mediadores fibrinolíticos dentro de los geles de fibrina. No se vieron diferencias entre la lisis de geles gruesos y finos cuando se utilizaron altas concentraciones de plasmina o u-PA en el flujo a través de los geles.

La concentración del fibrinógeno produce un efecto muy claro en la estructura final de la fibrina y su disolución: a mayor concentración de fibrinógeno, mayor $DO_{máx}$ y mayor tiempo de lisis (Figura 2). Del mismo modo, la lisis de fibrina generada por diferente concentración de trombina es proporcional a la $DO_{máx}$ alcanzada (Figura 4B).

Alteraciones de la fibrina y estados patológicos

Las redes de fibrina se modifican, además, en una serie de estados patológicos. La glucosa aumenta el entrecruzamiento de la fibrina y el grosor de las fibras, disminuyendo la permeabilidad, tanto *in vitro* como *ex vivo* (Figura 3)¹³. La fibrina de pacientes con mieloma mostró menor fase de latencia, presentando una estructura más compacta y ramificada cuya lisis resultó disminuida (Figura 3). En el síndrome nefrótico se observan redes de fibrina compactas y rígidas, resistentes a la lisis¹⁴.

Hay numerosos trabajos que vinculan las alteraciones de la fibrina y su lisabilidad para explicar los mecanismos de diferentes patologías, principalmente en casos particulares de trombosis, como enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, etc. Se compara-

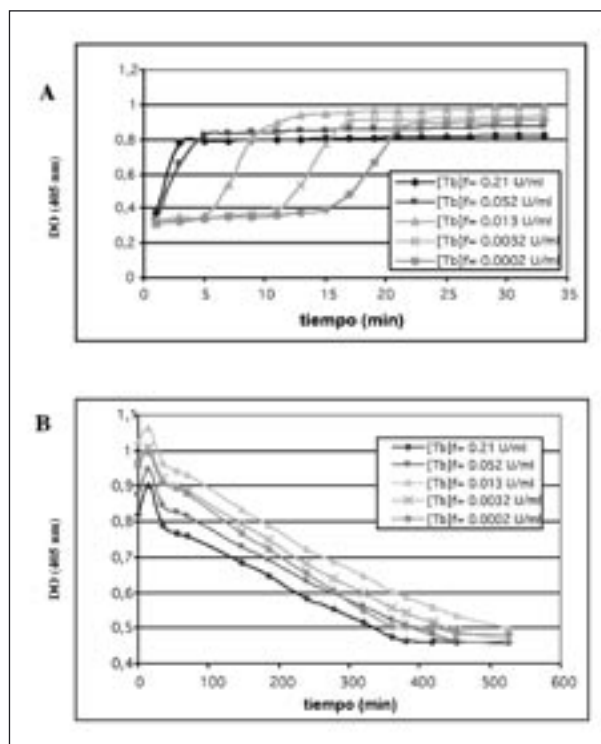


Figura 4. Ensayo de A) formación y B) lisis de fibrina obtenida con distintas concentraciones de trombina (ensayo en dos etapas).

ron las características de la fibrina de 100 jóvenes con enfermedad coronaria arterial prematura *versus* 100 controles con niveles hemostáticos semejantes¹⁵. La fibrina de estos pacientes comenzó a polimerizar antes que la de los controles, mostraron una estructura densa, menos permeable, formada por fibras más gruesas.

Por otra parte, la fibrina de 38 pacientes menores de 45 años con infarto de miocardio resultó más compacta, menos permeable, con fibras más gruesas. La función fibrinolítica deteriorada de estos pacientes fue asociada al aumento de la actividad plasmática de PAI-1 y a la estructura anormal de la fibrina¹⁶. Resultados semejantes se reportaron en un estudio de 33 pacientes post-infarto de miocardio¹⁷ que mostraron, además, aumento de fibrinógeno plasmático, factor von Willebrand, PAI-1 y lipoproteína (a) comparados con 33 controles sanos. Además, la rigidez de la fibrina detectada en estos pacientes resultó un predictor independiente de la enfermedad arterial coronaria prematura y de hipofibrinólisis.

Los alelos Val 34 del F XIII y A α 312 Ala del Fbg están asociados a riesgo aterotrombótico, aunque estas relaciones no han sido explicadas por estudios clínicos y de laboratorio. Se relacionaron interacciones entre la estructura y función de la fi-

brina con polimorfismos de Fbg (A α Thr 312 Ala) y FXIII (Val 34 Leu), además de otros factores de riesgo cardiovascular, en 125 pacientes con accidente cerebrovascular (ACV)¹⁸. Se ha obtenido fibrina más compacta y menos permeable relacionada con la presencia de estos alelos que podrían explicar las asociaciones encontradas con el riesgo trombótico.

En nuestro laboratorio se estudió el efecto de altas concentraciones de homocisteína (Hcy: factor de riesgo independiente para enfermedad aterosclerótica) sobre distintas propiedades de la fibrina. El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica demostraron que la Hcy produjo redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control¹⁹. Los geles de fibrina provenientes de fibrinógeno incubado con Hcy resultaron menos porosos, rígidos y más resistentes a la deformación por fuerza centrífuga.

Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA). Sin embargo, el aminoácido no modificó la actividad biológica de plasmina, plasminógeno, ni de sus activadores. Por lo tanto, la lisis dificultada estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos evaluados²⁰.

En síntesis, más allá de los detalles moleculares, la fibrina no es igual en cualquier circunstancia: puede variar por diferentes condiciones fisiológicas o estados patológicos, y sus características van a determinar su función y permanencia en circulación. Las alteraciones de la molécula de fibrinógeno pueden producir fibrina anormal, de diferente disolución, ya sea que permanezca tiempos prolongados en circulación induciendo la formación de otros trombos, o bien que se degrade anticipadamente produciendo riesgo hemorrágico. El aumento de calcio incrementa la rigidez y porosidad de la red.

La fibrina tiene una importante función como cofactor de la fibrinólisis. La activación del plasminógeno y la acción de la plasmina sobre la fibrina dependen de la estructura de la red. Las redes compactas son lisadas más lentamente, mientras que dentro del mismo gel las fibras delgadas son disueltas antes que las gruesas. Por otra parte, las fibras gruesas resultan mejor cofactor de la activación del plasminógeno.

Si bien se han hecho grandes avances en la comprensión de situaciones fisiopatológicas que producen diferente respuesta fibrinolítica fisiológica o inducida por fármacos, queda aún mucho por dilucidar.

Bibliografía

- Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug; 3(8):1894-904. Review.
- Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89: 409-419.
- Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R and Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3 D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110.
- Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361.
- Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:116-24.
- Wu JH, Siddiqui K, Diamond S. Transport phenomena and clot dissolving therapy: an experimental investigation of diffusion-controlled and permeation-enhanced fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1994; 72 (1): 105-12.
- Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y. A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost*. 2006 Aug; 4(8): 1738-46.
- Blombäck B, Banerjee D, Carlsson K, Hamsten A, Hessel B, Procyk R, Silveira A, Zacharski L. Native fibrin gel networks and factors influencing their formation in health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 281: 1-23.
- Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (Factor XIII) Mediated Cross-linking of Fibrinogen and Fibrin. *Thromb Haemostasis* 2001; 86:1221-1228.
- Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 610-21.
- Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 1992; 267: 24259-24263.
- Sabovic M, Blinc A. Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. *Eur J Physiol* 2000; 440 [Suppl]: R134-R136.
- Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hassel B, Johnson H, et al. Altered properties of the fibrin gel structure in the patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1519-1532.
- Yoshida Y, Shiiki H, Iwano M, Uyama H, Hamano K, Nishino T, Dohi K. Enhanced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with nephrotic syndrome. *Nephron*. 2001 May; 88(1):2 4-9.
- Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 2002 Oct 8; 106(15): 1938-42.
- Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost*. 1996 Oct; 76(4): 535-40.
- Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):2567-73.
- Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet*. 2003 Apr 26; 361(9367): 1424-31. Erratum in: *Lancet*. 2003 Jun;361(9376):2250
- Lauricella AM, Quintana I, Kordich L. Effect of homocysteine thiol group on fibrin networks: Another possible mechanism of harm. *Thrombosis Research* 2002, 107: 75-79.
- Lauricella AM, Quintana IL, Sassetti B, Castañón MM, Kordich LC. Influence of homocysteine on fibrin network lysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 181-6.