

Tesis de Posgrado

El sistema fibrinolítico en pacientes sépticos

Duboscq, Cristina

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

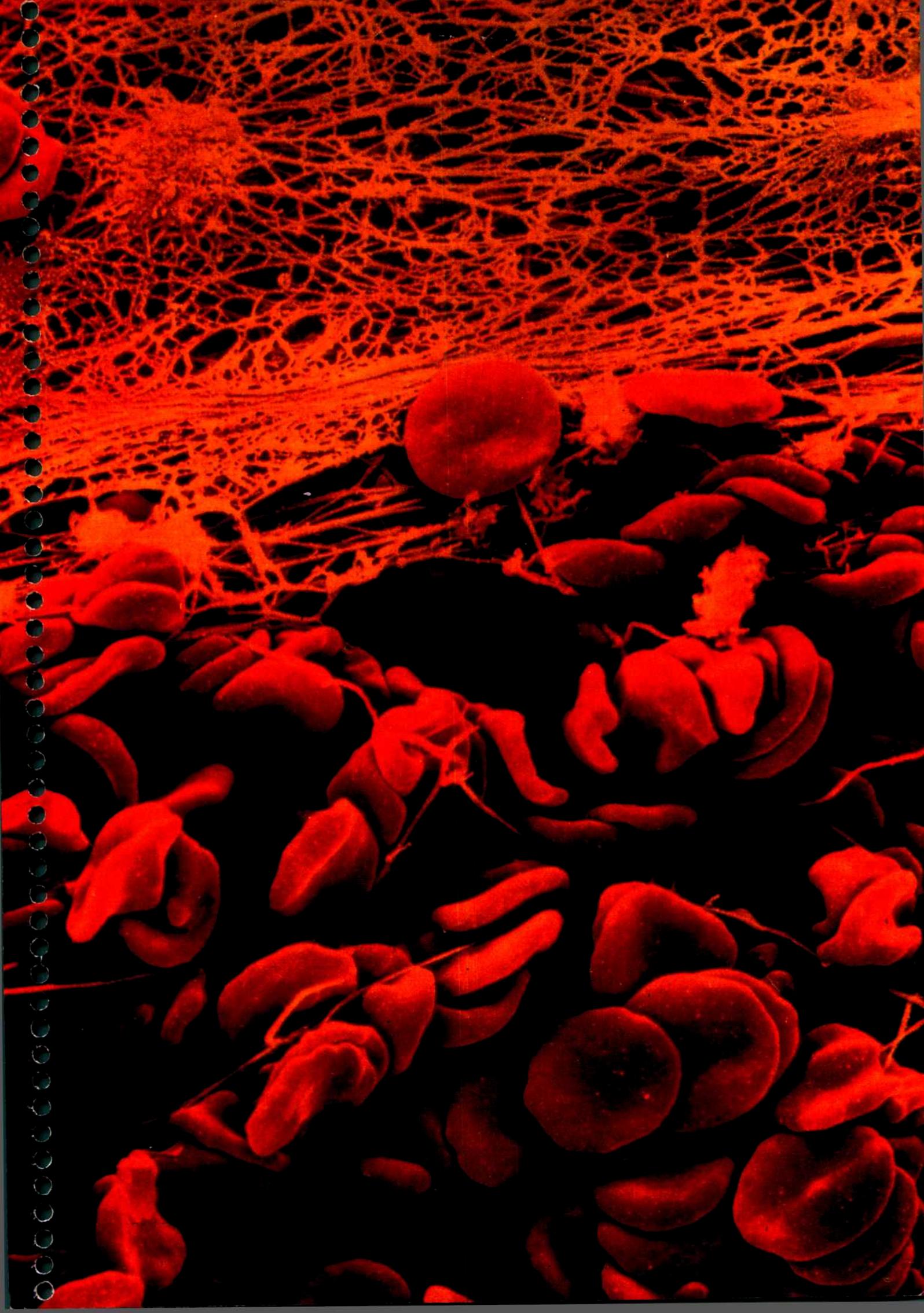
This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Duboscq, Cristina. (1997). El sistema fibrinolítico en pacientes sépticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2919_Duboscq.pdf

Cita tipo Chicago:

Duboscq, Cristina. "El sistema fibrinolítico en pacientes sépticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2919_Duboscq.pdf



**EL SISTEMA FIBRINOLITICO
EN PACIENTES SEPTICOS**

Lic. Cristina Duboscq
Directora: Dra. Lucía Kordich

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Tesis para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 1997 -

2 9 1'9

1
J

Resumen

Sepsis es la respuesta inflamatoria sistémica a la infección, que cursa con una lesión endotelial, producto de la activación de diversos sistemas plasmáticos y celulares, los que conducen, entre otras alteraciones, a un desbalance hemostático.

Estudios previos de la Dra. Kordich, en un grupo pequeño de pacientes sépticos, han demostrado que los niveles plasmáticos del plasminógeno (Plg) estaban disminuídos, mientras que los de α_2 -antiplasmina (APL) se mantenían normales.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- a) Estudiar en forma seriada los componentes del sistema hemostático (especialmente si el Plg estaba disminuído) y cuáles de ellos estaban relacionados con la probabilidad de sobrevida en 45 pacientes sépticos consecutivos.
- b) Investigar si la acción de las proteasas leucocitarias (que degradan in vitro al Plg generando, entre otros fragmentos, miniplasminógeno) podrían ser la causa del descenso de los niveles plasmáticos del plasminógeno.
- c) Estudiar in vitro si el miniPlg presenta actividad fibrinolítica.

La actividad plasmática de Plg fue significativamente menor ($p < 0,0001$) en el plasma de los pacientes sépticos [62 (15-106)%, mediana y rango] que en los grupos controles. La probabilidad de sobrevida puede expresarse en función de los niveles de Plg o de la relación Plg/APL ($p < 0,003$). La curva ROC permitió establecer un punto de corte para el Plg de 65%, la sensibilidad fue 90% y la especificidad, 66,7%; para un punto de corte Plg/APL=0,65, la sensibilidad fue 95,2% y la especificidad fue 70,8%.

La concentración del complejo elastasa - α_1 -inhibidor de proteinasa fue mayor en los sépticos que en los grupos controles.

El Plg humano purificado es degradado in vitro por elastasa leucocitaria, por extracto de enzimas leucocitarias y por polimorfonucleares degranulados. El proceso proteolítico origina fragmentos entre 45 y 30 kD analizados por Western blot. El fragmento de alrededor de 38 kD reacciona con un anticuerpo monoclonal anti-miniPlg.

El 33 % de los plasmas de los pacientes sépticos mostraro por Western blot una banda de 38 kD correspondiente a miniPlg, no presente en el plasma normal, sugiriendo la acción in vivo de las proteasas leucocitarias.

El miniPlg presentó menor capacidad fibrinolítica en todos los rangos de concentraciones estudiados (0,1-1,3 μ M) cuando es activado por el activador tisular del Plg (t-PA). El tiempo de lisis de un coágulo de fibrina fresco fue ($2,3 \pm 0,06$) min. para el Plg y ($9,8 \pm 0,1$)min para el miniPlg. El sistema miniPlg/rt-PA fue incapaz de lisar completamente un coágulo formado por acción de trombina sobre plasma humano depletado de Plg.

En resumen los pacientes sépticos presentan un estado hipofibrinolítico, por descenso de los niveles plasmáticos de Plg y porque el miniPlg, generado por acción de las enzimas leucocitarias, es activado sólo parcialmente por el t-PA.

Palabras claves: Sepsis-Fibrinólisis-Plasminógeno-Elastasa-Miniplasminógeno

Summary

Sepsis is a systemic inflammatory response to infection, with endothelin damage and alterations in the coagulation and fibrinolysis systems. Dr. Kordich previous studies of, in few septic patients, showed low plasminogen levels and normal α_2 -antiplasmina (APL) levels.

The aims of these thesis were:

- a) To study hemostatic system (specially Plg in the 45 septic consecutive patients during a week) and to investigated prospectively which hemostatic parameters has a prognostic value for survival from sepsis.
- b) To investigate if leukocyte protease action in vitro, (which degrades Plg, producing several fragments one of them called miniplasminogen) causes the decrease of Plg plasmatic levels.
- c) To study if miniPlg is able to produce clot lysis when it is activated by rt-PA, urokinase and streptokinase.

Plasminogen levels were significantly lower ($p < 0,001$) in plasma of septic patients [62(15-106)%, median and range] than control group.

Plasminogen alone on the ratio of Plg/antiplasmin were good markers for survival from septicemia ($p < 0,03$), studied by logistic regression.

The ROC curve allows to establish a cut off value of 65% for the plasminogen with a sensitivity of 95,2% and specificity of 70,8%.

Purified human Plg was degraded in vitro by elastase, leukocyte extract and degranulated polymorphonuclear producing several fragments between 45-30 kD studied by Western blot. The band of 38 kD reacts with miniplasminogen selective monoclonal antibody.

MiniPlg is less efficient than Plg to produce clot lysis in all the studied concentrations (0,1-2 μ M).

Clot lysis time was ($2,3 \pm 0,06$) min. for Plg and ($9,8 \pm 0,1$) min for miniPlg. In Plg depleted human plasma miniPlg is unable to produce the complete clot lysis in presence of rt-PA.

Septic patients show a hypofibrinolytic state due to decreasing of plasmatic Plg levels and because of miniPlg, produced by leukocyte protease Plg digestion, has a poor fibrinolytic activity when it is activated by rtPA.

Keywords: Sepsis-Fibrinolysis-Plasminogen-Elastase-Miniplasminogen

*Existe un libro abierto para todos
los ojos: la naturaleza*

J. Rousseau

A mis amores

Agradecimientos

A la Dra. Lucía Kordich, mi directora de tesis, quien me guió con fe y afecto en mi aprendizaje de la Hemostasia. Por ayudarme a encontrar mi propio conocimiento y no sólo compartir el suyo.

A la Lic. Irene Quintana por la revisión de la puesta en texto de mi tesis y fundamentalmente por brindarme su cálida amistad en estos años.

A la Bioq. Eleonora Rossi y a la Lic. Valeria Genoud, mis compañeras del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis por compartir con buena onda y afecto nuestro trabajo de cada día.

A la Lic. Marisa Vizcargüenaga y a Stella Maris Lingua por entrenarme con paciencia y dedicación en el Laboratorio de Hemostasia.

A la Dra. J. María Tomio, por su disposición incondicional para responder mis diversas inquietudes durante todos estos años.

A la Dra. Alcira Nesse por su compañerismo y apoyo en estos años.

A la Dra. Gabriela Bergonzelli por su apoyo aún a la distancia.

Al Dr. J.M. Castagnino, mi primer tutor y a la Dra. Beatriz Sassetti, por su orientación en mis comienzos.

Al Lic. Pablo Porterie y a la Bioq. Ethel Bassilotta, por colaborar en la etapa previa de selección y caracterización de las muestras.

A la Dra. Ana Haedo por el asesoramiento en el tratamiento estadístico de los resultados.

Al Dr. Desire Collen por donar el rt-PA utilizado en este trabajo.

Al Dr. Néstor Wainsztein por la selección de los pacientes.

A mis colegas de la cátedra de Análisis Biológicos que han facilitado mi tarea diaria.

A mis alumnos de todos estos años porque con sus inquietudes y sus pensamientos me han permitido crecer.

A todos aquellos, que aún sin saberlo, han contribuido en la realización de esta tesis.

A mis padres; a Claudio, mi marido y a Alejandro y Florencia, mis hijos, por compartir el esfuerzo de todos estos años.

A Dios y a cada uno,

Gracias.

NOTA: Este trabajo ha sido subsidiado parcialmente por el CONICET (PID Nro 244/88) y la Fundación Roemmers.

Indice

INTRODUCCION

I- EL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA-----	1
I.1-Generalidades-----	1
I.2-Componentes del sistema plasminógeno/plasmina-----	3
I.2.1-Plasminógeno-----	3
I.2.2-Plasmina-----	8
I.2.2.1-Acción de la plasmina sobre el fibrinógeno-----	9
I.2.2.2-Acción de la plasmina sobre la fibrina-----	10
I.2.3-Activadores del sistema plasminógeno/plasmina-----	13
I.2.3.1-Activador tisular del plasminógeno (t-PA)-----	14
I.2.3.2-Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA)-----	20
I.2.3.3-Activadores exógenos: Los agentes trombolíticos-----	25
I.2.4-Inhibidores del sistema plasminógeno/plasmina-----	29
I.2.4.1-Inhibidores de plasmina-----	30
I.2.4.2-Inhibidores de los activadores del plasminógeno-----	32
I.2.4.3-Otros inhibidores-----	35
I.2.5-Moduladores de la actividad fibrinolítica-----	37
I.3-El sistema Fibrinolítico:El sistema plasminógeno/plasmina y la hemostasia-----	39
I.3.1-Sistema de coagulación-----	40
I.3.2-Fisiología de la lisis del coágulo-----	42
I.3.3-Hemorragia o trombosis: El resultado de un desbalance hemostático-----	44
I.3.3.1-Hipofibrinólisis y trombosis-----	44
I.3.3.2-Hiperfibrinólisis y hemorragia-----	46
I.4-El sistema plasminógeno/plasmina en otros procesos biológicos-----	47
I.4.1-Remodelación tisular-----	47
I.4.2-Ovulación-----	48
I.4.3-Angiogénesis-----	49
I.4.4-Procesos proliferativos-----	49
I.4.5-Arteriosclerosis-----	50

II- LAS ENZIMAS LEUCOCITARIAS -----	51
II.1-Polimorfonucleareutrófilo-----	51
II.1.1-Gránulos del neutrófilo-----	55
II.1.2-Distribución de los neutrófilos-----	57
II.1.3-Función de los granulocitos neutrófilos-----	59
II.1.3.1-Quimiotaxis y movimiento celular-----	59
II.1.3.2-Fagocitosis y degranulación-----	60
II.1.3.3-Acción microbicida-----	61
II.2.-Proteasas del neutrófilo-----	63
II.2.1-Colagenasa-----	64
II.2.2-Catepsina G-----	65
II.2.3-Mieloblastina o proteinasa 3 leucocitaria-----	65
II.2.4-Elastasa leucocitaria-----	66
II.2.4.1-Acción proteolítica de la elastasa leucocitaria sobre los componentes del sistema de coagulación.-----	70
II.2.4.2-¿La elastasa leucocitaria es una enzima anti o profibrinolítica?-----	71
II.2.4.3-Acción de la elastasa leucocitaria sobre el plasminógeno: miniplasminógeno.-----	72
II.3- Leucocitos e inflamación-----	74
 III- HEMOSTASIA Y SEPSIS -----	 77
III.1-Sepsis: Definiciones-----	77
III.1.1-Fisiopatología de la sepsis-----	79
III.2-El laboratorio de hemostasia en sepsis-----	82
 OBJETIVOS	
I-Objetivos -----	92
II-Objetivos específicos-----	93

MATERIALES Y METODOS

I. EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA EN SEPSIS -----	93
I.1.-Población-----	93
I.2.-Estudio de los componentes plasmáticos del sistema de coagulación-----	95
I.2.1-Pruebas globales-----	95
I.2.2-Ensayos funcionales de los factores de coagulación-----	96
I.2.3-Dosaje de los inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación-----	97
I.3-Estudio de los componentes plasmáticos del sistema fibrinolítico-----	100
I.3.1-Pruebas globales-----	100
I.3.2-Ensayos funcionales de los compontes del sistema fibrinolítico-----	101
I.3.3-Determinaciones antigénicas de los componentes del sistema fibrinolítico	103
I.4-Otras determinaciones-----	103
I.5-Tratamiento estadístico de los datos-----	104
I.5.1-Análisis exploratorio de los datos y comparación de poblaciones-----	104
I.5.2-Determinación del marcador predictivo de sobrevida:Regresión Logística	104
I.5.3-Curva ROC (Receiving Operating Characteristic)-----	106
II.DEGRADACION DEL PLASMINOGENO: Miniplasminógeno ---	108
II.1-Purificación y caracterización de plasminógeno-----	108
II.1.1-Purificación de plasminógeno-----	108
II.1.2-Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)-----	110
II.1.3-Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida-----	110
II.2-Degradación de Plg por acción de elastasa pura: Obtención de miniplasminógeno-----	110
II.2.1-Dosaje de la actividad de elastasa-----	110
II.2.2-Acción de la elastasa leucocitaria sobre el plasminógeno humano purificado-----	111
II.2.3-Obtención y caracterización de miniplasminógeno-----	112

II.3-Degradación del plasminogeno por el extracto de enzimas leucocitarias-----	112
II.3.1-Preparación del extracto de enzimas leucocitarias-----	112
II.3.2-Acción del extracto leucocitario sobre el plasminógeno-----	113
II.4-Proteólisis del plasminógeno, in vitro, por polimorfonucleares degranulados---	114
II.4.1-Obtención de polimorfonucleares-----	114
II.4.2-Degranulación de los polimorfonucleares en presencia de plasminógeno-	114
II.4.3-Determinación del porcentaje de degranulación-----	115
II.4.4-Determinación de la actividad de mieloperoxidasa (MPO)-----	115
II.5-Investigación de la presencia de miniplasminógeno en el plasma de pacientes sépticos-----	116

III-ACTIVIDAD FIBRINOLITICA DEL MINIPLASMINOGENO-117

III.1-Actividad de plasmina y miniplasmina sobre un coágulo de fibrina fresco-----	117
III.2-Actividad amidolítica de miniplasmina sobre distintos sustratos cromogénicos-----	118
III.3-Activación de miniplasminógeno por uroquinasa-----	118
III.3.1-Efecto del fibrinógeno-----	119
III.3.2-Efecto de la fibrina-----	119
III.4-Activación de miniplasminógeno por estreptoquinasa-----	120
III.5-Activación de miniplasminógeno por r-tPA-----	120
III.5.1-Efecto de fibrinógeno, los monómeros de fibrina solubles y la fibrina---	121
III.6-Comparación del efecto fibrinolítico del plasminógeno y miniplasminógeno en sistemas purificados y en medio plasmático-----	121
III.7-Determinación de los tiempos de lisis en plasma de pacientes sépticos libre de plasminógeno-----	122

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

I- EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA EN SEPSIS -----	123
I.1.-Población y tratamiento-----	123
I.2.-Estudio de los componentes plasmáticos del sistema de coagulación-----	125
I.3-Estudio de los componentes plasmáticos del sistema fibrinolítico-----	129
I.4-Otras determinaciones-----	132
I.5-Estudio del marcador predictivo de sobrevida por Regresión Logística (RL)----	133
I.6-Conclusiones-----	137
II- DEGRADACION DEL PLASMINOGENO: Miniplasminógeno --	139
II.1-Obtención y caracterización de plasminógeno humano-----	140
II.2-Degradación del plasminógeno por acción de elastasa leucocitaria pura:	
obtención de miniplasminógeno-----	141
II.2.1-Obtención y caracterización de miniplasminógeno-----	143
II.3-Degradación del plasminógeno por el extracto de enzimas leucocitarias-----	144
II.4-Proteolisis del plasminógeno, in vitro, por polimorfonucleares degranulados---	147
II.5-Investigación de la presencia de miniplasminógeno en el plasma de pacientes	
sépticos-----	150
II.6-Conclusiones-----	152
III-ACTIVIDAD FIBRINOLITICA DEL MINIPLASMINOGENO -	153
III.1-Actividad de plasmina y miniplasmina sobre un coágulo de fibrina fresco-----	154
III.2-Actividad de miniplasmina frente a sustratos cromogénicos-----	155
III.3-Activación de miniplasminógeno por uroquinasa-----	156
III.4-Activación de miniplasminógeno por estreptoquinasa-----	157
III.5-Activación de miniplasminógeno por t-PA recombinante-----	158
III.6-Comparación del efecto fibrinolítico del plasminógeno y miniplasminógeno en	
sistemas purificados y en plasma humano normal libre de plasminógeno-----	161

III.7-Determinación de los tiempos de lisis en plasma de pacientes sépticos libres de plasminógeno-----	165
II.8-Conclusiones-----	165

DISCUSION GENERAL

I- PLASMMINOGENO: UN PARAMETRO HEMOSTATICO

IMPORTANTE EN SEPSIS-----	167
----------------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA-----	173
--------------------------	------------

ABREVIATURAS-----	193
--------------------------	------------

DIFUSION DE LOS RESULTADOS-----	195
--	------------

Introducción

EL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA

I.1- GENERALIDADES

El sistema proteolítico plasminógeno/plasmina está constituido por una proenzima, denominada plasminógeno (Plg), el cual es convertido a plasmina (Plm), la enzima activa del sistema, por acción de diversos activadores del plasminógeno^{1,2}. La plasmina generada degrada numerosas proteínas, entre las cuales la fibrina es una de las más importantes. El sistema Plg/Plm está regulado por los inhibidores específicos de Plm (α_2 - antiplasmina) y por los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1, PAI-2 y PAI-3)^{3,4} (Tabla 1, Fig. I.1).

El sistema Plg/Plm fue descrito por primera vez con el término de sistema fibrinolítico por Dastre en 1893⁵. Posteriormente, Astrup⁶ descubrió que el extracto de diversos órganos lisaban los coágulos sanguíneos, y Tagnan denominó plasminógeno a la fracción globulínica sérica, activable por cloroformo a una enzima capaz de lisar fibrina, a la cual llamó plasmina⁷. De este modo el plasminógeno y la plasmina recibieron ese nombre por similitud a otro sistema plasmático, el tripsinógeno y la tripsina y se lo denominó en conjunto, sistema fibrinolítico.

En 1948 Mc Farlane comienza a describir al sistema fibrinolítico como un sistema que está en equilibrio dinámico con el sistema de coagulación.⁸ La fibrina formada durante este proceso es degradada por el sistema fibrinolítico para restablecer el flujo sanguíneo.

En la última década diversos autores han demostrado que el sistema Plg/Plm, inicialmente denominado fibrinolítico, también interviene en otros procesos biológicos, como la ovulación, migración de los espermatozoides, fertilización, embriogénesis, reparación tisular y metástasis⁹, razón por la cual se ha propuesto llamar a este sistema con su denominación actual, sistema plasminógeno/plasmina, y

reservar el término fibrinolítico para la acción del sistema Plg/Plm en relación a la lisis del coágulo de fibrina.

	Peso Molecular (kD)	Conc. Plasmática ($\mu\text{g/ml}$)
Plasminógeno	90	216
Uroquinasa	53	0,1
t-PA	68	0,005
u-PA	54	0,008
α_2-antiplasmina($\alpha_2\text{APL}$)	63	60
α_2-macroglobulina ($\alpha_2\text{M}$)	725	2100
PAI-1	52	0,05
PAI-2	46/70	<0,005
Glicoproteína rica (HRG) en histidina	37/42	100

Tabla 1. Características de los componentes del sistema Plasminógeno/Plasmina

PLASMINOGENO

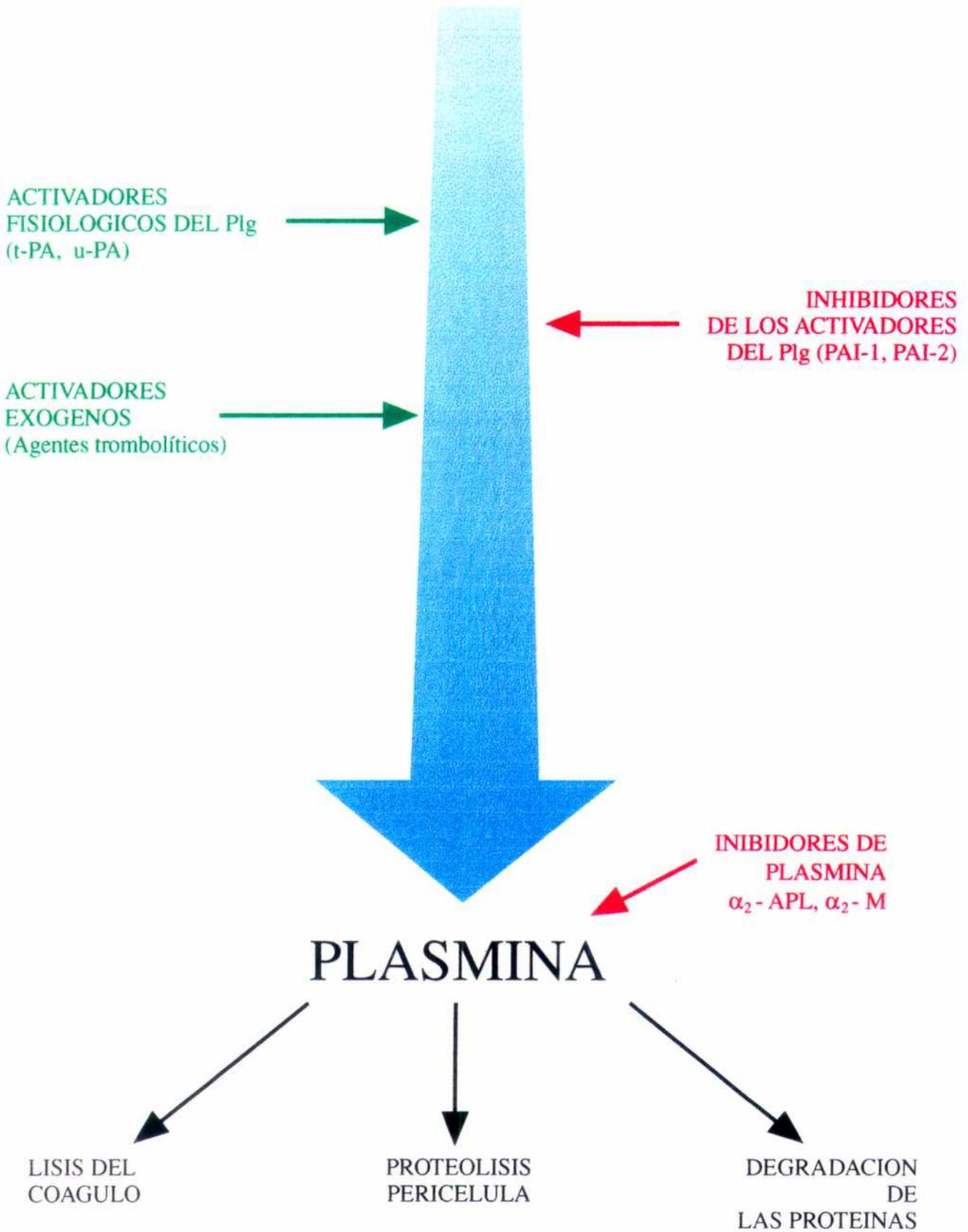


Fig. I . 1 - Sistema plasminógeno - plasmina.

I.2- COMPONENTES DEL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA

I.2.1- PLASMINOGENO

El plasminógeno (Plg) es el zimógeno de la enzima activa plasmina, componente principal del sistema. El Plg se sintetiza en hígado, su concentración plasmática es de $1.6 \mu\text{M} + 0.2$ (200 $\mu\text{g/ml}$). En los neonatos la concentración plasmática del plasminógeno es la mitad de la concentración en el adulto y alcanza niveles normales al sexto mes de vida. Los niveles de Plg varían ligeramente con la edad, el sexo y el tabaquismo; la concentración de Plg no varía con el ejercicio físico ni con el ritmo circadiano^{10,11}. Los niveles de Plg aumentan en el segundo y tercer trimestre del embarazo, con la anticoncepción oral, en la obesidad, hipotiroidismo, en pacientes con trasplantes de riñón e hígado^{12,13,14}. Se han reportado niveles plasmáticos de plasminógeno disminuídos en coagulación intravascular diseminada, sepsis, leucemia, hepatopatías, hipertiroidismo y postcirugía^{15,16,17}.

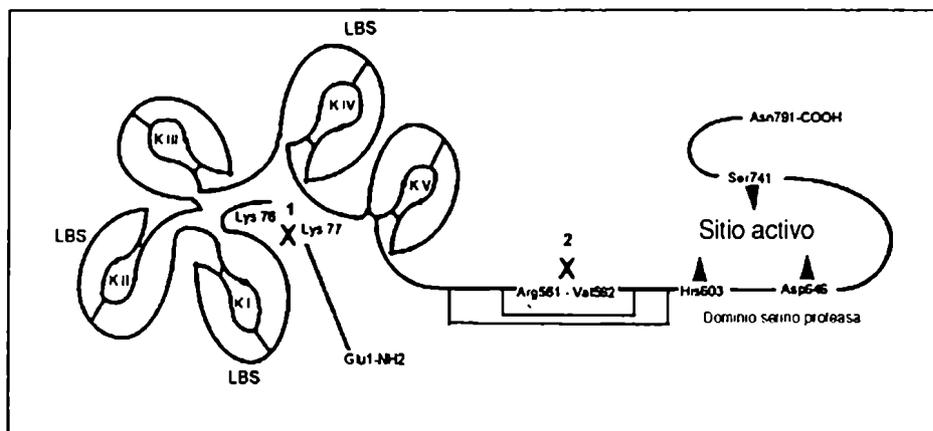


Fig. I.2- Esquema de la estructura molecular del plasminógeno.

El Plg es una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular determinado por secuenciación aminoacídica, de 92 kD, conteniendo 790 residuos aminoacídicos con un ácido glutámico en el extremo N-terminal¹⁸. Este Plg nativo se denomina Glu-plasminógeno. (Fig. I.2) Existen dos tipos de Plg plasmáticos separables por electroforesis sobre agarosa-lisina: el Plg tipo I, que constituye alrededor del 33%, glicosilado en Asn₂₈₉ y Thr₃₄₆ y el Plg tipo II, glicosilado sólo en Thr. Cada una de estas fracciones pueden ser separadas por isoelectroenfoque en 6 formas de diferentes puntos isoeléctricos.¹⁹ Estas variantes heterogéneas tienen distinto contenido en ácido siálico.

La secuencia aminoacídica predicha por clonación del DNA, concuerda con la obtenida por secuenciación aminoacídica, excepto por 4 asignaciones y la presencia de un aminoácido isoleucina extra, en posición 65^{20,21}.

La molécula de Plg presenta una región aminoterminal de aproximadamente 80 aminoácidos, seguido de 5 kringles, numerados (1→5) desde el extremo N-terminal²².

Mas allá del kringle5 se encuentra el enlace Arg₅₆₁- Val₅₆₂ el cual es clivado por los activadores del Plg originando plasmina, una proteína de 2 cadenas. En resumen la molécula del Plg contiene: el dominio serinoproteasa en el extremo C-terminal, los dominios kringles y la región del péptido N-terminal. (Fig. I.2)

El dominio serinoproteasa constituido por los residuos Val₅₆₂-An₇₉₁, contiene la tríada catalítica Asp, His, Ser, que se expone durante la activación del plasminógeno a plasmina. La plasmina es una serinoproteasa muy activa que hidroliza enlaces peptídicos carboxi-terminal a los residuos de arginina y lisina.

Los dominios kringles fueron las primeras estructuras de proteínas plasmáticas que se determinaron por cristalografía de rayos X²³. Los kringles descritos para el Plg también están presentes en el factor de crecimiento del

hepatocito, en el factor similar factor de crecimiento del hepatocito (HGF-like), en la protrombina ²² y en la apolipoproteína ²⁴. Los kringles presentan de 80-85 residuos aminoácidos, 3β “trenzas” (strands) cortas antiparalelas perpendiculares entre sí, tres enlaces disulfuros y un racimo de residuos aromáticos. La función principal de los kringles es mediar las interacciones proteína-proteína y proteína-célula.

Los kringles intervienen en la unión del plasminógeno a la fibrina, a la α_2 -anti-plasmina, a la proteína rica en histidina (HRGP), a la trombospondina y a receptores celulares ²². Los ligandos pequeños, denominados genéricamente análogos de lisina, que unen al plasminógeno intacto o a sus fragmentos que contienen kringles, son: L-lisina, ácido 6-aminohexanoico (6-AHA), el ácido trans (aminometil) ciclohexanocarboxílico (t-AMCHA), benzamidina, arginina y compuestos relacionados. Los análogos de lisina se unen sólo a un sitio en cada kringle, llamados sitios de unión a lisina (LBS: lysine binding sites).

Los LBS consisten en una depresión hidrofóbica dentro del dominio kringle formada por residuos aromáticos con una doble carga aniónica central en un extremo y un centro catiónico en el otro ^{25,26}. Existen otros sitios de unión en los kringles denominados sitios de unión aminohexil (AH sites, amino-hexil sites) que unen ligandos lisina no carboxi terminal (ligandos aminohexil: AH).

La estructura y la afinidad de cada kringle por los distintos ligandos ha sido estudiada utilizando fragmentos proteolíticos obtenidos por digestión del plasminógeno con elastasa.

El kringle 1 (K1: residuo 84-162). Tiene un LBS con alta afinidad por los análogos de lisina, α_2 -antiplasmina (APL), HRGP y algunas formas de fibrina. La α_2 -antiplasmina se une al Plg, principalmente por el K1. También presenta un sitio aminohexil ^{27,28,29}.

Los kringles 2 y 3 (K2: residuos 166-243 y K3: 256-333). Presentan afinidad débil por 6-AHA. No se han realizado estudios por separado.

El kringle 4 (K4: residuos 358-435). Tiene sitios de unión a análogos de lisina carboxi-terminal, pero no se une a ligandos del tipo aminohexil. Presenta gran afinidad por la tetranectina. El LBS del K4 no está expuesto en el Plg nativo.

El kringle 5 (K5: residuos 462-541). Presenta un sitio de unión a ligandos del tipo aminohexil (AH). El kringle 5 se une a benzamidina, arginina, trombospondina y con afinidad moderada a la fibrina ²².

El dominio N-terminal: regula la conformación y la activación de la molécula nativa. El factor de crecimiento de los hepatocitos y otros factores de crecimiento similares al factor de crecimiento del hepatocito presentan homología estructural con este dominio del plasminógeno ³⁰.

La región N-terminal del Glu-Plg es clivada por plasmina o por el activador tipo uroquinasa originando 3 moléculas con 3 residuos N-terminal diferentes: Met ₆₉, Lys ₇₈, Val ₇₉ ³¹. Estos tres tipos de Plg se denominan genéricamente Lys-plasminógeno. La velocidad de activación del Lys-Plg a Lys-Plm por los activadores del Plg es mayor que la velocidad de activación del Glu-Plg. La vida media del Lys-Plg es más corta (98 días) que la del Glu-Plg (28 días) ³².

Estudios de microscopía electrónica y de “scattering” de baja resolución indican que el Plg es una molécula compacta con múltiples asociaciones intramoleculares en dominio-dominio.

La conformación cerrada ocurre por una unión no covalente entre un residuo arginina o lisina del péptido terminal y alguno de los LBS presentes en la molécula.

La unión de un ligando análogo de lisina induce un cambio conformacional a la conformación abierta. Ponting ²² postula la existencia de 3 conformaciones distintas para el Plg:

* plasminógeno α : un espiral compacto formado por Glu-plasmina y Glu-plasminógeno, con interacciones K5-péptido N-terminal y K123-K4.

* plasminógeno β : una conformación parcialmente abierta de Lys-Plg que presenta interacciones K123-K4. El Glu Plg también adoptaría esta forma en presencia de ligandos análogos de lisina.

* plasminógeno γ : una conformación totalmente abierta para el Lys-Plg y para el Glu-Plg sin ninguna interacción intramolecular.

El plasminógeno interacciona con diversas proteínas como fibrina, trombospondina, tetranectina y la proteína rica en histidina. El Plg se une específicamente a la fibrina a través de los sitios LBS. Esta unión es inhibida in vitro por la lipoproteína (a) [Lp(a)] y por los ligandos análogos de lisina ²⁴. Si bien estudios in vitro han demostrado que la Lp(a) inhibe la activación del plasminógeno a plasmina mediada por el activador tisular, pacientes con niveles elevados de Lp(a) no mostraron evidencias clínicas de hipofibrinólisis.

La unión del plasminógeno a ciertas proteínas induce un cambio conformacional que expone el enlace Arg₅₆₀-Val₅₆₁, produciendo una mayor velocidad de activación del Plg a plasmina. Así el K4 del plasminógeno se une reversiblemente a la tetranectina, una proteína plasmática, favoreciendo su activación ³³. El Plg también forma un complejo con la trombospondina, lo cual potencia la activación del Plg a nivel extracelular, interacción mediada por el K5 ^{34,35}.

El 50% del Plg plasmático circula unido a la glicoproteína rica en histidina (HRG) formando un complejo reversible equimolecular ³⁶. La HRG compite con la fibrina por los sitios LBS del Plg, lo cual origina, in vitro, una menor activación de plasminógeno a plasmina. Pacientes con altos niveles de HRG presentan un aumento de riesgo trombótico, asociado a hipofibrinólisis ³⁷.

El plasminógeno interactúa con diversas células mediante receptores celulares de plasminógeno. Las células sanguíneas, excepto los eritrocitos y las células endoteliales unen Plg con alta afinidad ³⁸.

La unión del Plg a las distintas células presenta características comunes:

- a) Todas las células tienen una constante de disociación de alrededor de 1 μ M.
- b) Existe un gran número, alrededor de 10^7 sitios por célula, de receptores para Plg.
- c) La unión del Plg a las células es inhibida en todos los casos por lisina y los ligandos análogos de lisina, sugiriendo que el Plg se une a todas las células a través de un mecanismo común. El sitio LBS de alta afinidad del K1 y el sitio LBS de baja afinidad de K4 son los que intervienen en la unión del Plg a las células.

Los receptores celulares para Plg potencian la activación del sistema fibrinolítico, localizando la actividad de la plasmina sobre la superficie celular y evitan la inhibición de la plasmina unida a la célula por la α_2 -antiplasmina ³⁹. Dado el alto número de receptores del Plg por célula, estos receptores estarían constituidos por componentes proteicos y no proteicos de la membrana celular. Las proteínas de membrana con lisina en la región carboxi terminal podrían actuar como receptores proteicos del Plg, mientras que los gangliósidos serían los componentes no proteicos que actuarían como ligantes del Plg ³⁸. De este modo la proteólisis celular estaría regulada por la capacidad celular de modular la expresión de los receptores del plasminógeno.

I.2.2- PLASMINA

La plasmina obtenida por activación del Plg, es una serinoproteasa de dos cadenas unidas por puente disulfuro. La transición del Plg a plasmina involucra la ruptura del enlace Arg₅₆₀-Val₅₆₁. La cadena pesada de la plasmina contiene los 5 kringles y la cadena liviana contiene el sitio activo en el extremo carboxi terminal.

La plasmina cataliza la hidrólisis de los enlaces C-terminal a residuos arginina y lisina de la fibrina. La heparina inhibe, incrementa o no tiene efecto sobre la actividad plasmínica ^{40,41,42}.

La plasmina es inhibida por la α_2 -antiplasmina, principal inhibidor fisiológico de la enzima, por la formación de un complejo equimolecular.

La plasmina libre en circulación es inactivada más rápidamente por la α_2 -antiplasmina, que la plasmina unida a la fibrina o a los diversos receptores celulares; la plasmina unida está así protegida de la acción del inhibidor porque tiene ocupados los sitios LBS, a través de los cuales reacciona con la α_2 -APL ^{43,44,2}. Estas interacciones están reflejadas en los valores menores de las constantes de reacción de la inhibición de plasmina unida a fibrina por α_2 -antiplasmina que los de plasmina libre ⁴⁵.

ACCION DE LA PLASMINA SOBRE EL FIBRINOGENO

La fibrinólisis es la acción proteolítica de la plasmina sobre el fibrinógeno. El fibrinógeno es una glicoproteína dimérica formada por tres pares de cadena polipeptídicas, denominadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ ; la fórmula molecular es $(A\alpha, B\beta \text{ y } \gamma)_2$. La hemimolécula está unida covalentemente a través de enlaces disulfuros simétricos en el extremo N-terminal. El clivaje de los enlaces peptídicos del fibrinógeno por plasmina está compuesto de 3 reacciones simultáneas: una rápida, otra lenta y una muy lenta. In vitro, la plasmina cliva rápidamente la porción C-terminal de la cadena $A\alpha$, luego cliva los extremos N-terminal y C-terminal de la cadena $B\beta$ y por último, la plasmina hidroliza la cadena γ .

La acción de plasmina sobre el fibrinógeno genera un conjunto de fragmentos típicos descritos por primera vez por Nussenzweig et al, denominados conjuntamente productos de degradación del fibrinógeno (PDF) ⁴⁶. El fragmento X (300-260 kD) se forma cuando la plasmina cliva el extremo C-terminal de la cadena

A α y porciones del extremo N-terminal de la cadena B β . La acción de la plasmina sobre el fragmento X origina el fragmento Y de 150 kD.

La hidrólisis del fragmento Y da origen a los fragmentos D de 94 kD y E de 50 kD. Los distintos fragmentos generados no son entidades homogéneas ya que presentan una gran variabilidad en los extremos C-terminal y N-terminal. Fisiológicamente la acción de plasmina sobre el fibrinógeno no ocurre, ya que los activadores fisiológicos del plasminógeno prácticamente no activan al Plg en medio plasmático y las pequeñas cantidades de plasmina que se generan son inhibidas por la α_2 -antiplasmina en pocos segundos.

Se observa fibrinólisis en pacientes con una activación exacerbada del sistema fibrinolítico, ya sea debido a un tratamiento trombolítico o a un descenso de los inhibidores del sistema fibrinolítico.

ACCION DE LA PLASMINA SOBRE LA FIBRINA

La fibrinolisis es la acción proteolítica de la plasmina sobre la fibrina que conduce a la lisis del coágulo (solubilización de la red de fibrina).

El fibrinógeno es convertido a fibrina por acción de la enzima trombina; la trombina cliva el enlace Arg₁₆-Gly₁₇ en la cadena A α , liberando al fibrinopéptido A. Luego la trombina rompe el enlace Arg₁₄-Gly₁₅ de la cadena B β , liberando el fibrinopéptido B ⁴⁷. El monómero de fibrina generado inicialmente, se homopolimeriza para formar “trenzas” largas denominadas protofibras. El polímero de fibrina, que se forma luego de la activación con trombina, es entrecruzado por acción del factor XIIIa de coagulación, una transglutaminasa ^{48,49}, originando un gel (fibrina insoluble o estable) de protómeros de fibrina di, tri y tetraméricos. Estos entrecruzamientos aumentan la estabilización a través de contactos interfibras o puntos “branch”, incrementando la elasticidad y la resistencia mecánica de la fibrina.

La fibrina estable es insoluble en urea y otros solventes que disuelven la fibrina no estabilizada.

Estudios *in vitro* han demostrado que la estructura tridimensional y rigidez de la red de fibrina formada depende de varios factores. La velocidad de activación del fibrinógeno por trombina es el factor cinético que determina la estructura del gel; ⁵⁰ altas concentraciones de trombina originan *in vitro* protofibras finas y espacios líquidos pequeños dentro de la red ⁵¹. A mayor concentración de fibrinógeno se obtienen fibras de fibrina más gruesas.

Otro factor que modula la estructura de la red durante su formación es la fuerza iónica: a mayor fuerza iónica menor porosidad del gel y fibras de mayor calibre. Las proteínas plasmáticas también modulan la estructura de la red ya que constituyen impedimentos espaciales en el proceso de polimerización.^{52,53} La fibronectina se incorpora a las protofibras aumentando el ancho de las fibras. Los coágulos obtenidos a partir del plasma citratado o sangre entera son más porosos que aquellos formados a partir del fibrinógeno puro ⁵⁴. Cuando se induce la formación del coágulo en medio plasmático con trombina, se observa que a mayor concentración de trombina el gel de fibrina es de menor porosidad y está formado por fibras de menor espesor. ⁵³

In vitro, la plasmina hidroliza la fibrina entrecruzada mediante un mecanismo complejo en el cual se producen fragmentos de alto peso molecular, combinaciones de fragmentos X e Y y fragmentos de bajo peso molecular, que en su mayoría incluyen al fragmento D entrecruzado, llamado Dímero-D (160kD). Todos estos fragmentos se denominan, en conjunto, productos de degradación de la fibrina (pdf).

El complejo D₂-E sería el que se genera en mayor proporción cuando hay acción de plasmina *in vivo*. En pacientes con hiperfibrinólisis se ha observado un aumento de productos de degradación de la fibrina y de dímeros D. (Fig. I.3. Esquema de la degradación de fibrina por plasmina).

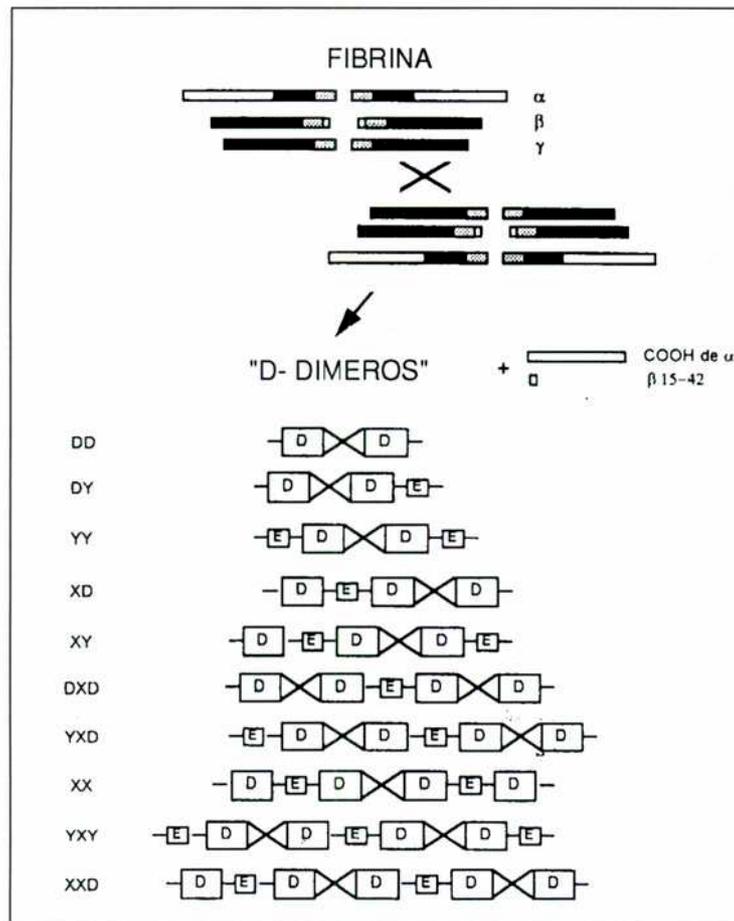


Fig. I.3 - Degradación de la fibrina por la plasmina.

In vivo, la fibrina parcialmente degradada por plasmina en medio plasmático induce una mayor activación del sistema fibrinolítico y la presencia del fragmento X sería esencial para la activación óptima del sistema fibrinolítico. La acción de plasmina sobre la fibrina y la activación del plasminógeno mediada por los activadores fisiológicos dependen de la estructura del gel.⁵³ Estudios in vitro han demostrado que geles con fibras de mayor calibre son más rápidamente lisadas por plasmina. En resumen, cuando se forma el coágulo de fibrina la lisabilidad del mismo va a depender no sólo de los componentes del sistema fibrinolítico sino

también de las propiedades fisicoquímicas del gel de fibrina ya que, se ha demostrado que la estructura de la red de fibrina juega un rol preponderante en la modulación del sistema fibrinolítico.

I.2.3- ACTIVADORES DEL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA

La activación del Plg a plasmina ocurre por la acción de diversos activadores que clivan el enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂ del plasminógeno (Fig.I.1). Existen tres vías de activación del sistema fibrinolítico:

- a) mediada por el activador tisular del plasminógeno (t-PA).
- b) mediada por el activador tipo uroquinasa (u-PA).
- c) mediada por agentes exógenos o terapéuticos (agentes trombolíticos)

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) ha sido señalado como el principal activador fisiológico en la remoción de la fibrina del árbol vascular⁵⁵.

La alta especificidad del t-PA por la fibrina sería la causa de que la activación del Plg mediado por t-PA esté restringida al coágulo sanguíneo².

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) se une a un receptor celular (u-PAR) y participa principalmente en la preteólisis pericelular, activando al sistema Plg/Plm en diversos procesos biológicos^{56,57}. Las condiciones por las cuales el u-PA podría participar en la disolución del coágulo in vivo no han sido aún establecidas⁵⁵.

La activación intrínseca del Plg que involucra al factor XII de coagulación, quininógenos de alto peso molecular y precalicreínas sería mediada por el (u-PA)⁵⁸.

Hasta el momento no se han reportado deficiencias genéticas del t-PA o u-PA en el hombre, por lo cual no ha podido establecerse fehacientemente el rol de cada activador en los diversos procesos biológicos humanos donde interviene el sistema plasminógeno/plasmina.

Los agentes fibrinolíticos exógenos (uroquinasa, estreptoquinasa, complejo SK-Plg anisolado). activan al sistema Plg/Plm en forma sistémica.

La estafilokinasa y las variantes recombinantes de t-PA y u-PA inducen la lisis específica del coágulo en plasma humano.

2.3.1-ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINOGENO (t-PA)

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) es una serinoproteasa que fue aislada por primera vez de útero humano ⁵⁹. Actualmente se sabe que el activador tisular del plasminógeno, el activador vascular y el activador sanguíneo del Plg son idénticos inmunológicamente ⁶⁰ y constituyen una única entidad química, denominada t-PA.

En un comienzo algunos autores describieron al t-PA como una proteína de dos cadenas (tct-PA: two chain tisular plasminogen activator) por algunos autores ^{59,61}; en cambio Binder la describió como formada por una sola cadena polipeptídica (sct-PA: single chain tisular plasminogen activator) ⁶². Rijken et al han clarificado este punto al descubrir que el t-PA puede ser obtenido como una proteína de una sola cadena de masa molecular 72000 en presencia de aprotinina o como una proteína de 2 cadenas de masa.

El activador tisular del plasminógeno interviene fundamentalmente en la activación del sistema Plg/Plm en su rol de sistema fibrinolítico. Es decir, el t-PA activa al Plg principalmente cuando hay formación de fibrina. Ratones transgénicos t-PA ^{-/-} sólo muestran alteraciones en las funciones fibrinolíticas del sistema Plg/Plm: disminución de la lisis del coágulo e incremento en la tendencia trombótica ⁵⁵. molecular 33000 y 39000 cada una, en ausencia de aprotinina ⁶⁰.

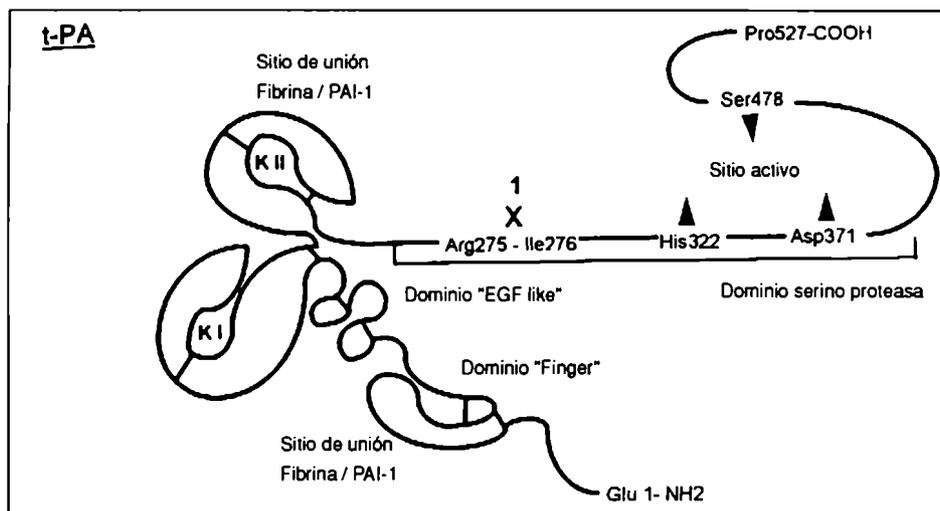


Fig. I.4 - Esquema de la molécula de t-PA.

La concentración plasmática del t-PA está afectada por el ritmo circadiano y la actividad de t-PA se incrementa entre las 9 y las 15 hs. Los niveles antigénicos de t-PA son menores a la mañana que a la tarde ^{12,63}. La línea basal de t-PA plasmático de una persona sana y descansada en la mañana es 5mg/l ^{64,65}. Los niveles antigénicos de t-PA son mayores en hombres que en las mujeres ¹².

Los estímulos fisiológicos que inducen al aumento de t-PA plasmático son: acetilcolina, acidosis, bradiquinina, calcio, endotelinas, ejercicio físico, histamina, interleukina-1, radicales oxígeno, trombina, factor de necrosis tumoral, estrés, adrenalina, prostaglandinas ^{66,67,68,69}.

Los niveles plasmáticos de t-PA también se ven afectados por diversas drogas: a) la administración prolongada de heparina no fraccionada o de heparina de bajo peso molecular induce un aumento en los niveles antigénicos del t-PA plasmático ⁷⁰; b) los anticonceptivos orales aumentan significativamente los niveles de actividad del t-PA ⁷¹; c) el estanozolool, un esteroide anabólico, produce un descenso en la

actividad de t-PA ⁷² y d) la administración de 1-deamina-8-d arginina vasopresina (DDAVP) induce una fuerte liberación del t-PA de la célula endotelial. ⁷³

El activador tisular de una sola cadena es una cadena polipeptídica de 572 residuos aminoacídicos con una serina en el extremo N-terminal, que activa al Plg clivando la unión peptídica Arg₅₆₁-Val₅₆₂.

Esta serino proteasa presenta varios dominios homólogos con otras proteínas:

- a) Los residuos aminoacídicos 1-43 son homólogos del dominio “finger” de la fibronectina.
- b) El dominio 45-91 es homólogo del precursor del factor de crecimiento epidérmico.
- c) Los dominios 92-173 al 180-261 son homólogos de los residuos Kringles del plasminógeno.
- d) La región que comprende los residuos aminoacídicos 276 a 527 es homóloga a la región catalítica de las otras serinoproteasas. Esta región contiene el sitio activo His₃₂₂-Asp₃₇₁ y Ser₄₇₈ ⁷⁴.

Los distintos dominios del t-PA están involucrados en las diversas funciones de la enzima incluyendo la unión a fibrina, la unión a receptor de células endoteliales, la activación del Plg y la rápida depuración in vivo. La membrana plasmática de la célula endotelial tiene una proteína ligante de t-PA (t-PAR). Este receptor para t-PA tiene un único sitio de unión para t-PA y Lys-Plg pero no une el activador tipo uroquinasa (u-PA). Este hecho permite una activación eficiente del Plg sobre la superficie endotelial ⁷⁵.

Verall et al descubrieron la presencia de otro receptor celular específico para t-PA en las neuronas de gránulos cerebelosos ⁷⁶. El t-PA, así localizado en la superficie celular, daría origen a grandes zonas con actividad proteolítica que intervendrían en la migración celular y axonal.

Existen otros receptores celulares para t-PA que median los procesos de degradación in vitro del activador en las células endoteliales de cordón umbilical y en las líneas Hep62 de hepatomas humanos

El sct-PA se sintetiza principalmente en las células del endotelio vascular y es secretado al plasma de manera continua. Las diversas regiones del endotelio vascular secretan distintas cantidades de sct-PA: las extremidades superiores secretan 4 veces más sct-PA que las extremidades inferiores.

El activador tisular del plasminógeno de dos cadenas se obtiene por acción de la plasmina y la calicreína, que hidrolizan el enlace peptídico Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ del activador tisular del plasminógeno de una sola cadena ^{2,90}. Rijken ha demostrado que el activador del Plg de una cadena es convertido en el activador de dos cadenas durante el proceso fibrinolítico ⁶⁰.

El activador tisular de dos cadenas (tct-PA), unidas por un puente disulfuro, reacciona más rápidamente con los sustratos tripeptídicos sintéticos (Wallen 1979). Sin embargo, las dos formas del activador sct-PA y tct-PA, presentan igual actividad fibrinolítica en sistemas purificados compuestos de plasminógeno y fibrina a concentraciones plasmáticas ⁶⁰.

El tct-PA reacciona más rápidamente con el inhibidor diisopropilfluoro que el activador de una sola cadena ⁶¹.

Las mayores velocidades de reacción reportadas para las distintas interacciones del tct-PA con moléculas de bajo peso molecular, inhibidores o sustratos sintéticos, sugieren que hay una mayor exposición del sitio activo en el activador de dos cadenas que en el activador de una sola cadena; sin embargo esta modificación estructural no sería suficiente para inducir una mayor actividad proteolítica sobre moléculas más grandes como el Plg.

El sct-PA y el tct-PA forman sendos complejos con la α_2 -macroglobulina (α_2M); estos complejos activador α_2M mantienen la actividad proteolítica sobre el plasminógeno ⁷⁸.

CINETICA DE ACTIVACION DEL PLASMINOGENO POR t-PA. ROL DE LA FIBRINA

La cinética de activación del Plg por ambos tipos de activadores tisulares tct-PA y sct-PA, cumplen el modelo de Michaelis Menten. Ambas formas del activador tisular tct-PA y sct-PA, presentan afinidades muy bajas por el Glu-Plg en ausencia de fibrina; las constantes de Michaelis (K_m) en estas condiciones son mayores que $60 \mu M$. La fibrina aumenta la velocidad de reacción del Plg por ambas formas del activador tisular ⁷⁹.

La fibrina actúa en la reacción de activación del plasminógeno por t-PA tanto como sustrato de plasmina, como catalizador de la reacción (catálisis heterogénea). Las constantes de Michaelis y las constantes catalíticas para el Glu-Plg son 3 veces mayores que para el Lys-Plg ⁷⁹.

El fibrinógeno aumenta ligeramente, en forma concentración dependiente, la velocidad de reacción t-PA/Plg en sistemas puros; sin embargo dado que el $K_{m_{Glu-Plg}}$ a concentraciones infinitas de fibrinógeno es $28 \mu M$ y la concentración plasmática de fibrinógeno alrededor de $1 \mu M$, el t-PA no convierte eficientemente el Glu-Plg en plasmina en medio plasmático. Si bien los valores de K_m hallados por otros autores ^{60,80} son diferentes, todos coinciden en que la presencia de fibrina aumenta la eficiencia catalítica del t-PA.

Las discrepancias entre los valores de K_m hallados podría deberse a los distintos medios donde se llevó a cabo la reacción y a las distintas metodologías utilizadas en la determinación de la actividad plasmínica. Actualmente los más aceptados son los estudios cinéticos realizados por Hoylaerts que sugieren un mecanismo de reacción secuencial ordenado. La fibrina se uniría al t-PA y luego el Plg también se uniría formando un complejo ternario cíclico sobre la fibrina. La unión inicial del t-PA a la

fibrina estaría gobernada por el dominio “finger”, una vez unido el t-PA a la fibrina la fuerza de la unión aumentaría a través del Kringle2 del activador ⁸¹.

El Plg por su parte se uniría a la fibrina por los sitios LBS y aminohexil, presente este último en el kringle 5. La unión del Plg a la fibrina se daría primero a través del sitio aminohexil del K5 y luego a través de los LBS; el resultado de estas interacciones es una mayor exposición del enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂. A medida que la fibrina es degradada se forman nuevos sitios de unión con mayor afinidad para el t-PA y también permite la unión de más moléculas de Plg.

La interacción de la fibrina y el K2 del t-PA está mediado por un LBS, en cambio en la interacción fibrina-dominio finger del t-PA no intervendrían los LBS. La fibrina parcialmente degradada por plasmina aumenta la velocidad de unión del t-PA a la fibrina. Este incremento estaría mediado parcialmente por los LBS del K2 y sería dependiente de la cantidad de residuos lisina carboxi terminal que se generen en la matriz de fibrina ⁸².

La estimulación óptima de la activación del Plg por t-PA depende de las modificaciones de la fibrina ocasionadas por la plasmina y requerirían la presencia de los dominios K1-4 del Plg.

La activación de Plg mediado por t-PA es entonces catalizada por la fibrina lo cual permite:

- a) un incremento en la concentración local de Plg sobre la superficie de fibrina
- b) una menor inactivación de la plasmina formada por su principal inhibidor, la α_2 -antiplasmina (tiempo de vida media de la plasmina unida a fibrina alrededor de 80 seg.) la plasmina libre, en cambio, es rápidamente inhibida por la α_2 -antiplasmina (tiempo de vida media de la plasmina libre 0.15 seg.).²⁸
- c) la plasmina formada en un principio convierte el sct-PA rápidamente, sugiriendo que si bien la fibrinólisis comienza con sct-PA, ocurre principalmente por la acción del tct-PA ⁷⁹.

El resultado final de todas estas interacciones es el aumento de, aproximadamente 1500 veces, la eficiencia catalítica del t-PA en presencia de fibrina; por lo cual el proceso fibrinolítico parece ser iniciado, estar confinado y ser dependiente de la fibrina.

I.2.3.2- ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO TIPO UROQUINASA (u-PA)

La uroquinasa fue aislada por primera vez de orina humana. Posteriormente se ha demostrado la presencia de diversos activadores tipo uroquinasa (u-PA) en las células de riñón ⁸³, células epidermales, fibroblastos, células “natural killer” ⁸⁴, monocitos, macrófagos y polimorfonucleares ⁸⁵, en células tumorales y en pequeñas concentraciones en plasma ⁸⁶ u-PA se une a un receptor específico que está presente en numerosos tipos de células. Este receptor celular es una proteína glicosilada heterogénea que une todas las formas de activadores tipo uroquinasa. El receptor para u-PA regularía la activación del plasminógeno a nivel de la superficie celular, interviniendo principalmente en la proteólisis celular.

El u-PA regulado por la expresión del receptor actuaría como activador del sistema Plg/Plm en una gran variedad de procesos biológicos: la involución de la glándula mamaria, implantación de las cigotas fertilizadas en el útero, inflamación, migración de las células inflamatorias, metástasis de las células malignas ^{87,88,89,90}. La acción del u-PA como activador del plasminógeno en presencia de fibrina, es aún controvertida.

El activador tipo uroquinasa de una sola cadena (single chain urokinase type plasminogen activator: scu-PA) es una glicoproteína de una sola cadena de masa molecular 54 kD, que contiene 4 residuos aminoacídicos ⁹¹ (Fig. I.5)

El scu-PA es sintetizado principalmente por las células endoteliales vasculares y renales. Las células tumorales producen 10 veces más scu-PA que las células normales.⁹³

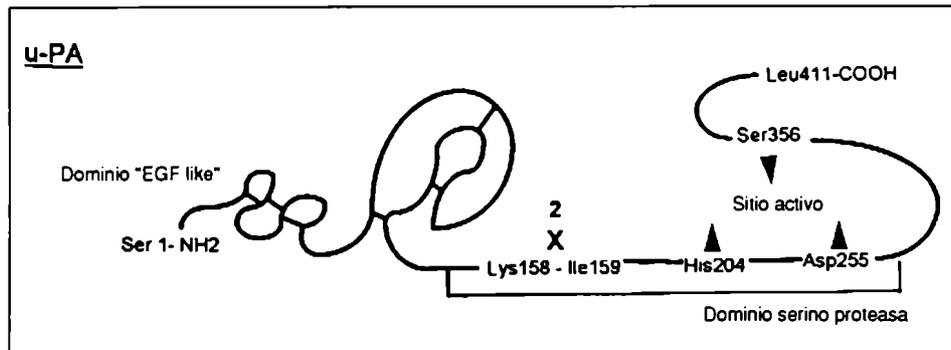


Fig. I.5 - Esquema de la molécula de u-PA.

En la cadena polipeptídica glicosilada pueden distinguirse varios dominios:

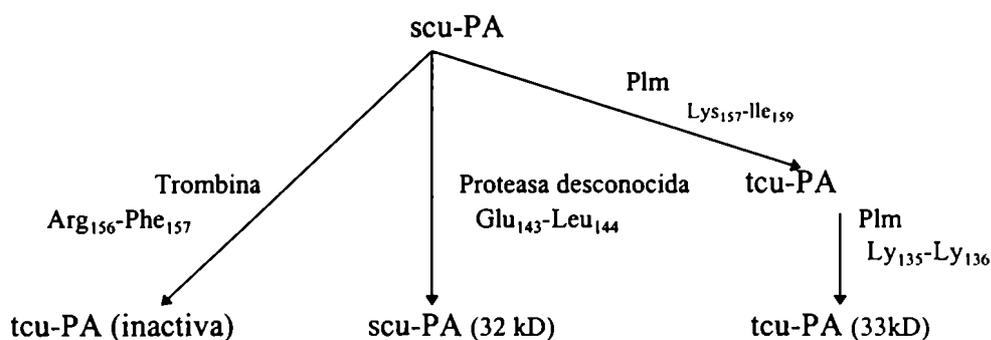
- a) el dominio N-terminal del residuo 1-19 es homólogo con el dominio del factor de crecimiento epidérmico.
- b) una región homóloga a los kringles presentes en la molécula de plasminógeno.
- c) en el extremo C-terminal se encuentra el sitio activo compuesto por la tríada catalítica característica de las serinoproteasas Asp₂₅₅, His₂₀₄ y Ser₃₅₆.

El scu-PA sufre distintos grados de proteólisis por acción de distintas enzimas, dando origen a otros activadores tipo uroquinasa:

- a) La plasmina y las calicreínas clivan el enlace peptídico Lys₁₅₈-Ile₁₅₉, originando el activador del Plg tipo uroquinasa de dos cadenas (tcu-PA: two chain urokinase type plasminogen activator). Las dos cadenas están unidas por un puente disulfuro.

- b) La hidrólisis del enlace peptídico Lys 135-Lys 136 del tcu-PA por acción de la plasmina origina el tcu-PA de bajo peso molecular (Mr 33kD)
- c) El scu-PA de 32 kD (scu-PA 32) se genera por proteólisis específica del enlace Glu₁₄₃-Leu₄₄ del scu-PA, por acción de una proteasa plasmática no identificada ⁸⁶.

En resumen el scu-PA es clivado por diversas enzimas:



Todas estas formas de activadores se denominan genéricamente activadores del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA), tienen un receptor común en distintas células, se unen a plaquetas humanas y células endoteliales y son inhibidos por el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI). ⁹³.

El scu-PA y el tcu-PA presentan diferencias en sus comportamientos enzimáticos:

- a) La actividad del scu-PA frente a sustratos sintéticos es menor que la del tcu-PA.
- b) El scu-PA se une in vitro específicamente a la fibrina; en cambio el tcu-PA no presenta especificidad por la fibrina. El tcu-PA activa tanto al plasminógeno plasmático circulante como al plasminógeno unido a la fibrina.
- c) La actividad enzimática del scu-PA para transformar plasminógeno a plasmina es discutida actualmente: Algunos autores sostienen que scu-PA presenta un potencial intrínseco de activación del plasminógeno en cambio otros investigadores postulan que el scu-PA es una proenzima genuina que no presenta actividad.

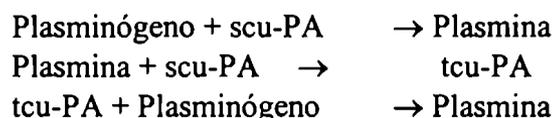
Diversos estudios han encontrado que la actividad del scu-PA in vitro es entre 0.1 a 0.5% del tcu-PA.

MECANISMO DE ACCION DEL scu-PA

Existen diversas hipótesis acerca del mecanismo de activación del Plg y la especificidad en la lisis del coágulo por acción del scu-PA.

Utilizando diversos mutantes de los u-PA se han realizado numerosos estudios in vitro en sistemas puros y en medio plasmático.

En mezclas de scu-PA y plasminógeno se generan rápidamente tcu-PA y plasmina. El análisis cinético de estas reacciones ha revelado que la conversión de scu-PA a tcu-PA y de plasminógeno a plasmina puede ser descrita por una secuencia de tres reacciones, cada una de las cuales cumple con la cinética de Michaelis Menten:



Estudios de la activación de Plg mediado por scu-PA en medio plasmático han demostrado que hay conversión del scu-PA a tcu-PA durante la lisis del coágulo; en estas condiciones sólo hay lisis sistémica del fibrinógeno, cuando hay una conversión importante del scu-PA a tcu-PA, que genere una cantidad de Plm tal que exceda a la concentración plasmática de APL. La eficiencia y especificidad de la lisis del coágulo de fibrina por scu-PA en medio plasmático e in vitro, requeriría la amplificación del proceso fibrinolítico por conversión de scu-PA a tcu-PA. La generación de tcu-PA constituiría un mecanismo de retroalimentación positivo sobre el sistema y localizaría la acción de tcu-PA sobre el coágulo de fibrina evitando la activación del Plg en forma sistémica.

Aún no está claramente establecido la forma por la cual el scu-PA activaría al Plg en presencia de fibrina.

- a) Lyman et al sostienen que el scu-PA tiene un potencial intrínseco de activación del Plg que está bloqueado en el medio plasmático por un inhibidor competitivo; en presencia de fibrina el scu-PA se uniría preferencialmente al coágulo y activaría plasminógeno a plasmina.
- b) Pannell y Guerrevich postulan que el scu-PA sería incapaz de activar al plasminógeno circulante en su conformación nativa (Glu-Plg); pero activaría al Lys-Plg unido a la fibrina parcialmente degradada.
- c) Kassi y Peterson sostienen que el scu-PA es un zimógeno y que para que haya fibrinolisis el scu-PA debe ser transformado en tcu-PA por plasmina o calicreínas.

Estudios con scu-PA recombinante plasmina resistente sugieren que el mecanismo fisiológico de acción del scu-PA podría no ser idéntico al mecanismo de activación del plasminógeno y lisis del coágulo por acción del scu-PA en medio plasmático *in vitro*.

Diversos scu-PA recombinantes plasmina resistente, es decir incapaces de transformarse en tcu-PA, originarían un efecto trombolítico en conejos con trombosis venosa, sin inducir la activación sistémica del sistema fibrinolítico.

Estos hallazgos sugerirían que el scu-PA tendría un potencial intrínseco de activación del plasminógeno *in vivo*.

El sistema u-PA ha sido propuesto también como un sistema amplificador del t-PA ya que se ha observado que existe un efecto sinérgico cuando se utiliza t-PA seguido de u-PA en modelos experimentales de trombosis yugular en conejos y modelos terapéuticos en humanos. Al administrarse t-PA seguido de u-PA se obtiene un mejor efecto lítico que si se administra la misma dosis aisladamente^{94,95,96}.

Estudios en ratones transgénicos u-PA -/-, u-PA +/- y t-PA -/- demostraron que tanto el u-PA como el t-PA intervendrían en la prevención de los procesos inflamatorios y/o de daño endotelial.

I.2.3.3- ACTIVADORES EXOGENOS: LOS AGENTES TROMBOLITICOS

Los agentes trombolíticos son drogas que inducen la conversión de Plg a plasmina y por lo tanto la disolución del trombo existente. El objetivo principal de la terapia trombolítica es la disolución con alta especificidad del trombo, en el menor tiempo posible, para restablecer el flujo sanguíneo en el tejido dañado, razón por la cual continuamente se está investigando en el desarrollo de agentes trombolíticos con mayor potencia, seguridad y selectividad para fibrina⁹¹.

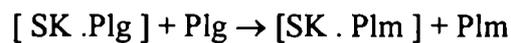
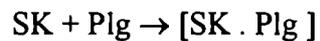
La uroquinasa (UK) y la estreptoquinasa (SK) fueron los primeros trombolíticos utilizados. La SK y UK activan en forma sistémica al sistema Plg/Plm, por lo tanto no sólo se degrada la fibrina sino que también sufren proteólisis otras proteínas plasmáticas como el factor VIII y V de coagulación, el fibrinógeno, factor von Willebrand y componentes del sistema complemento.

Los agentes trombolíticos de primera generación fueron desarrollados en los años 60.

La estreptoquinasa se aísla de ciertas colonias de streptococos β hemolítico y Tillet comprobó por primera vez que la administración sistémica de SK disolvía completamente el trombo formado en la oreja de un conejo. Actualmente está plenamente aceptado que la SK induce la disolución de trombos venosos y arteriales.⁹¹

La SK es altamente antigénica y la mayoría de los individuos sanos presentan anticuerpos antiSK en la sangre debido a infecciones β -hemolíticas previas. (Hoffman 1988). A pesar que estos anticuerpos circulantes disminuyen la efectividad de la SK, se ha logrado establecer un esquema de dosis fija para la administración de SK.

La SK, de 47 kD, no es una enzima sino que forma un complejo equimolecular con el Plg, induciendo un cambio conformacional en la molécula de Plg , exponiendo el sitio activo sin clivaje proteolítico. El complejo formado activa a otras moléculas de Plg a Plm ³⁶.



La SK no se une a la fibrina pero el complejo SK- Plg tiene afinidad a la fibrina por los sitios LBS del Plg a pesar de lo cual, se ha comprobado empíricamente que la SK activa al sistema fibrinolítico en forma sistémica.

La uroquinasa es una serinoproteasa de dos cadenas que existe en dos formas: una glicoproteína de 54 kD llamada UK de alto peso molecular (HMW-UK) y una forma degradada llamada UK de bajo peso molecular (LMW-UK).

La HMW-UK se aísla a partir de orina humana y la LMW-UK se obtiene a partir de células de riñón fetal humano ⁹⁷.

Ambos tipos de uroquinasa presentan propiedades farmacocinéticas similares. Las principales ventajas de la UK respecto a la SK es que la uroquinasa tiene menor antigenicidad y un tiempo de vida medio más corto; la mayor desventaja es su alto costo. La UK no se une a la fibrina y cuando se lo administra produce un estado proteolítico general.

Los agentes trombolíticos de segunda generación, fueron producidos por biotecnología: el t-PA recombinante y u-PA recombinante a partir de los años 80 y numerosos mutantes del t-PA y estafiloquinasa recombinante a partir de los años 90 .

El activador tisular del Plg recombinante (rt-PA) comenzó a producirse a partir de 1982, año en que se clonó el DNA del t-PA y se expresó en el ovario de hamsters.

El t-PA se aisló de células de melanoma de Bower, se caracterizó y se observó que cuando era administrado a pacientes con trombosis venosa el coágulo se disolvía. La purificación de t-PA de cultivos celulares era muy costosa, razón por la cual se vió limitado su uso como agente trombolítico hasta que se comenzó a producir el t-PA recombinante. El rt-PA se probó en diversos modelos animales y fue aprobado por la FDA en 1984 ⁹⁸.

Actualmente existen el rsct-PA denominado alteplase y el rtct-PA, llamado aneplase. La ventaja de este agente trombolítico es su alta especificidad por fibrina comprobada, porque se ha observado que cuando se administra rt-PA la actividad lítica permanece aún cuando la concentración plasmática de t-PA era prácticamente cero. Otra ventaja es que el rt-PA casi no produce fibrinólisis.

Diversos estudios han demostrado que el rt-PA presenta una cinética de activación del plasminógeno similar al t-PA humano. El rt-PA se utiliza actualmente en el tratamiento precoz del infarto de miocardio; la mayor desventaja es el alto costo de la droga.

Se han sintetizado diversos mutantes del rt-PA entre ellos, mutantes con menor clearance plasmático, mayor selectividad para fibrina, resistente a los inhibidores y variantes no glicosiladas, que actualmente son utilizadas en diversos estudios multicéntricos en Europa ⁹¹.

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa de una sola cadena recombinante, denominado samplase, se obtuvo por primera vez en 1980 cuando se clonó el cDNA del scu-PA y se expresó en *E coli*.

El rscu-PA degrada fibrina con un efecto sistémico menor que la uroquinasa. Cuando se administra scu-PA se observó una fase “lag” antes del comienzo de la

fibrinolisis. Collen ha sugerido que la fibrinolisis del coágulo mediada por scu-PA sólo ocurriría luego que la fibrina fuera degradada inicialmente por el t-PA ⁹⁹.

El complejo activador SK-plasminógeno “anisolayted” (APSAC) es el complejo SK-Plg, pero donde el sitio activo está acoplado a p-anisol. El APSAC tiene el sitio activo bloqueado pero presenta una alta afinidad por fibrina. Este agente trombolítico que presentó una mayor especificidad por el coágulo y causó menor fibrinólisis que la SK en los modelos animales estudiados, actualmente ha caído en desuso ⁷⁰.

Los agentes trombolíticos de tercera generación se produjeron a partir de los años 90 y son variantes de la molécula nativa de los activadores del plasminógeno.

Los agentes recombinantes quiméricos son moléculas que tratan de unir la capacidad trombolítica de alguna especie con la especificidad por fibrina de otras. En la última década se han realizado numerosas investigaciones para mejorar los agentes trombolíticos; se utilizan mutantes de los activadores del plasminógeno, moléculas quiméricas que conjugan dos activadores distintos; activadores de plasminógeno unidos a anticuerpos monoclonales antifibrina, etc. Si bien todos estos agentes trombolíticos son investigados en modelo de trombosis animal ninguno ha sido aprobado aún para su utilización en seres humanos ⁹¹.

Los activadores de Murciélago, presentes en la saliva del murciélago, son 4 activadores diferentes de Plg los cuales presentan homología por el t-PA. Todos los activadores del murciélago tienen un sólo kringle y alta especificidad por la fibrina.

La estafiloquinasa (SAK), es una proteína de 136 aa producida por algunas cepas del *Staphylococcus aureus*. La SAK forma un complejo estequiométrico 1:1 que activa otras moléculas de Plg.

La estafiloquinasa recombinante es más potente para disolver coágulos que la estafiloquinasa obtenida de *Staphylococcus* en diversos modelos animales ¹⁰⁰.

Permanentemente se están desarrollando y probando nuevos agentes trombolíticos por ingeniería genética. En general los agentes que son fibrina específicos causan menor proteólisis sistémica que los activadores que no se unen a fibrina. Según estudios recientes realizados con rt-PA, el problema, en realidad, no sería el tipo de activador utilizado sino su concentración. Así, ya que para eliminar rápidamente la obstrucción producida por el trombo, utilizarían dosis muy altas de agentes trombolíticos, estos perderían afinidad por la fibrina y producirían una fibrinólisis sistémica no deseada.

I.2.4- INHIBIDORES DEL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA

La inhibición del sistema plasminógeno/plasmina ocurre a nivel de la enzima activa mediante los inhibidores de plasmina y a nivel de los activadores del plasminógeno a través de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (Fig. I.1).

I.2.4.1- INHIBIDORES DE PLASMINA: α_2 -ANTIPLASMINA (APL)

El principal inhibidor fisiológico de plasmina es la α_2 -antiplasmina (APL), perteneciente a la familia de las serpinas (inhibidores de serinoproteasas). La concentración plasmática del inhibidor es 70 mg/ml (alrededor de 1 μ M) y su vida media 2.6 días ¹⁰¹.

La α_2 -antiplasmina es una glicoproteína de una sola cadena de masa molecular 70.000. La molécula está formada por 452 aminoácidos, contiene 2 puentes disulfuros y presenta tres dominios funcionales:

- 1) El sitio activo localizado en la región C-terminal está constituido por Arg₃₆₄ y Met₃₆₅¹⁰².
- 2) El sitio complementario de los sitios LBS del plasminógeno, cercano al extremo C-terminal, denominados sitios de unión a LBS (LBS-binding site)
- 3) El sitio de entrecruzamiento a glutamina, cercano al extremo N-terminal de la molécula¹⁰³.

En plasma y en sistemas puros la α_2 -antiplasmina forma un complejo equimolecular con la plasmina de masa molecular 140 kD. El complejo plasmina α_2 -antiplasmina no presenta actividad proteásica ni estearásica^{104,105}.

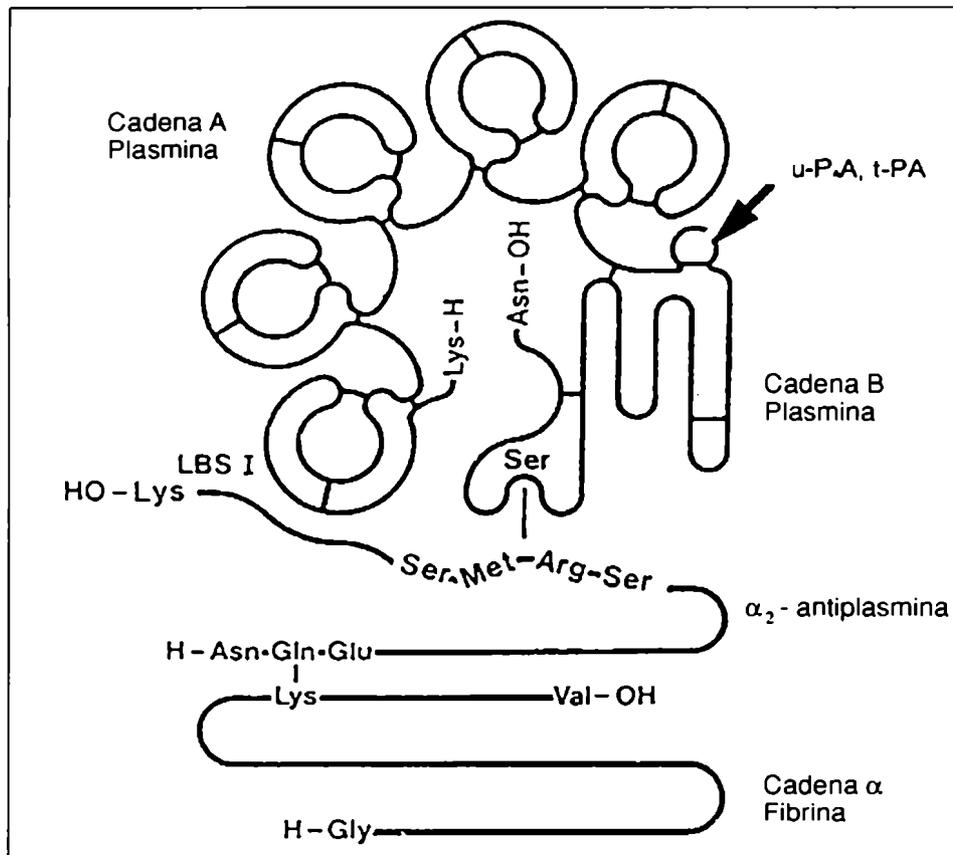


Fig. I.6 - Interacción de la α_2 -antiplasmina con la fibrina y la plasmina.

El mecanismo de inhibición ocurre en dos etapas:

- en la primera etapa se forma un complejo reversible que involucra la reacción de los sitios LBS de la Plm y los LBS de la α_2 -antiplasmina
- la segunda etapa, más lenta e irreversible, culmina con la formación de un complejo estable.

La formación del complejo se da a través de la formación de un enlace fuerte, probablemente covalente, entre el residuo serina del sitio activo de la plasmina y arginina, presente en el sitio activo de la α_2 -antiplasmina.

La plasmina libre es inhibida rápidamente por la α_2 -antiplasmina, en cambio cuando la plasmina es entrecruzada con la fibrina por acción del factor XIIIa de coagulación, el inhibidor atrapado en el coágulo es capaz de inhibir sólo la plasmina generada inicialmente en la superficie del mismo ^{103,104}. La plasmina comenzaría a lisar el coágulo cuando se genera una cantidad de plasmina tal que supere la concentración del inhibidor presente en el trombo.

I.2.4.2- INHIBIDORES DE LOS ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO

Los inhibidores de los activadores del plasminógeno han sido denominados genéricamente PAI (plasminogen activators inhibitors). Hasta el momento se han descrito cuatro proteínas diferentes con actividad inhibitoria: PAI-1, PAI-2, PAI-3 y proteasa Nexina.

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo-1 (PAI-1) es una glicoproteína de una sola cadena de masa molecular 52.000 que contiene 379 residuos aminoacídicos ^{107,106}; su sitio activo está localizado en los residuos aminoacídicos Arg₃₄₆-Met₃₄₇. Pertenece a la familia de las serpinas y se lo propone como el regulador primario de la activación del plasminógeno y de la proteólisis extracelular ^{108,109}.

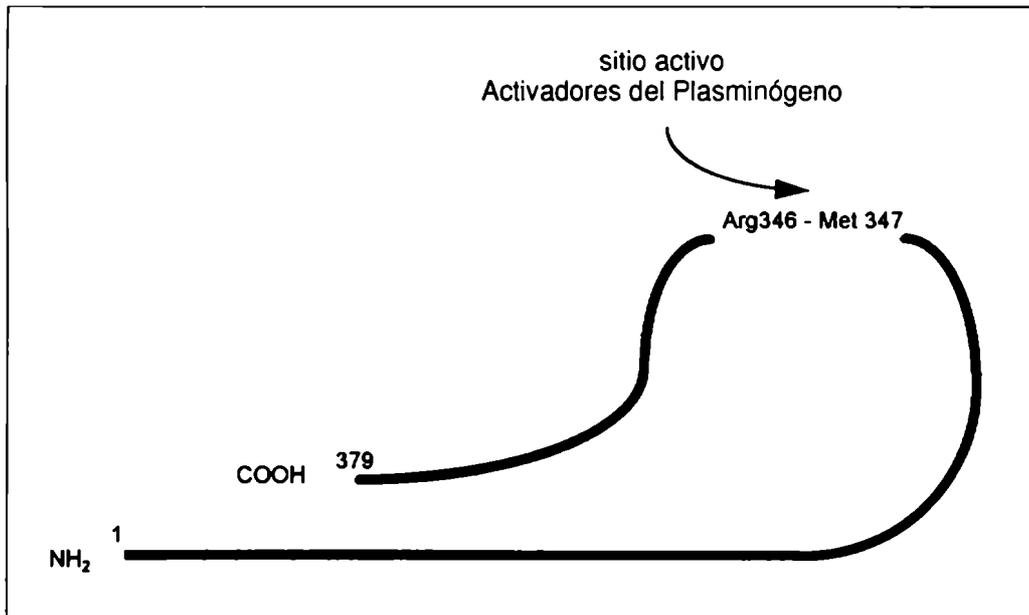


Fig. I.7 - Esquema de la estructura del PAI-1

El PAI-1 es el principal inhibidor fisiológico de los activadores del plasminógeno. Inhibe al t-PA de una sola cadena, al t-PA de dos cadenas y al activador del plasminógeno tipo uroquinasa^{110,111}. La inhibición de los activadores se produce por la formación de un complejo equimolecular estable¹¹².

El PAI-1 es producido por las células endoteliales, es liberado de los gránulos α de las plaquetas durante la activación plaquetaria y sintetizado in vitro por células de hepatomas inducidas por dexametasona .

Hasta el momento no han sido establecidos los mecanismos que regulan la secreción del PAI por las distintas células que lo sintetizan. Las células endoteliales incrementan la producción de PAI-1 cuando son estimuladas por algunas citoquinas o lipopolisacáridos^{113,114}.

El PAI-1 está presente en plasma en pequeñas cantidades, pero su concentración plasmática aumenta en procesos febriles e inflamatorios por lo que es considerado como una proteína reactante de fase aguda ^{115,116}.

Los niveles plasmáticos de PAI muestran variaciones circadianas; la actividad de PAI-I presenta un pico en la mañana temprano y luego desciende rápidamente.

Otro factor determinante de la concentración plasmática de PAI-1 es el polimorfismo genético; con el polimorfismo Hind III, el genotipo 1/1 tiene concentraciones plasmáticas de PAI-1 más elevadas que el genotipo 2/2 ¹¹⁷.

El PAI-1 es inestable en solución ya que se convierte espontáneamente en una forma latente inactiva por la pérdida de residuos cisteína y la formación de un enlace disulfuro intramolecular. El tratamiento de PAI-1 latente con agentes desnaturizantes, como SDS, reestablece la actividad inhibitoria ^{112,118}. El PAI-1 circula en plasma humano unido a las proteínas ligantes de PAI-1 (PAI-1 binding protein) las cuales estabilizan la forma activa del inhibidor. La mayor parte del PAI-1 activo, circula unida a la vitronectina (VN) ^{109,119} incrementando ocho veces su tiempo de vida media y localizando al inhibidor en los diversos tejidos.

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 2 (PAI-2) es un inhibidor perteneciente a la familia de las serpinas que inhibe rápidamente al tcu-PA y tct-PA pero prácticamente no inhibe sct-PA ¹⁰⁸.

Existen 2 formas de PAI-2: una no glicosilada, asociada a células de masa molecular 47b KD y otra glicosilada de 60b KD que es la secretada.

La proteína glicosilada contiene 393 residuos aminoacídicos y su sitio activo está formado por Arg₃₅₈-Thr₃₅₉ ¹²⁰.

Se identificó por primera vez en la placenta humana (Kawano 1968) pero también se sintetiza en monocitos humanos, macrófagos humanos, diversas líneas celulares mononucleares y en otros tipos celulares como células endoteliales y fibroblastos.

En condiciones fisiológicas los niveles plasmáticos de PAI-2 no son detectables pero aumentan significativamente en el tercer trimestre del embarazo.

Aunque el PAI-2 inhibe a los distintos activadores del Plg eficientemente, fisiológicamente está almacenado en compartimientos intracelulares. Así el PAI-2 representaría un reservorio de actividad antifibrinolítica ¹²¹.

El Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 3 (PAI-3) se encuentra en orina y en plasma a muy bajas concentraciones; presenta identidad inmunológica con el inhibidor de la proteína C (PC) activada ¹²².

PAI-3 inhibe PC activada, activador del plasminógeno tipo urinario de dos cadenas y muy lentamente al tct-PA en presencia de heparina ¹²³.

Aunque la concentración plasmática de PAI-3 (2 µg/ml) es alrededor de tres veces la concentración de PAI-1 y PAI-2, el PAI-3 es un inhibidor ineficaz de los activadores del Plg tipo uroquinasa, porque la cinética de inhibición en medio plasmático es muy lenta.

El PAI-3 inhibiría al u-PA en situaciones donde éste sobrepasara al efecto del PAI-1, como por ejemplo, en las terapias trombolíticas con urokinasa ¹²³.

I.2.4.3- OTROS INHIBIDORES

La α_2 macroglobulina es un inhibidor de proteasas de amplio espectro. Es una glicoproteína de 725 KD y está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas, unidas por 2 pares de puentes disulfuro. Cada par forma una subunidad y las dos subunidades están asociadas por enlaces no covalentes.

La α_2 - macroglobulina inhibe plasmina y reacciona con uroquinasa y t-PA, formando sendos complejos activadores α_2 M que mantienen la actividad proteolítica sobre el plasminógeno ^{2,124,125}. La acción antifibrinolítica de la α_2 M estaría dado por el hecho que los activadores unidos a α_2 M se depurarían más rápidamente que los activadores libres.

La reacción α_2 M- plasmina es mucho más lenta que entre plasmina y α_2 - antiplasmina.

La α_2 - macroglobulina podría funcionar como un reservorio anti fibrinolítico que sería utilizado en situaciones donde α_2 - antiplasmina se hubiera agotado.

La proteasa nexina I, es un inhibidor no específico de trombina u-PA y plasmina, secretado por la célula endotelial. La proteasa nexina se expresa en la membrana de la célula endotelial, compleja a la enzima activa y el complejo se internaliza y degrada por acción de las enzimas lisosomales ¹²⁶. El heparán sulfato de la superficie endotelial aumenta 200 veces la velocidad de reacción proteasa nexina I- trombina, sugiriendo que el principal rol fisiológico de la proteasa nexina I es inhibir trombina.

La proteasa nexina I actuaría como inhibidor del sistema fibrinolítico cuando las concentraciones de plasmina o u-PA excedieran la capacidad inhibitoria de la α_2 - antiplasmina y de los PAI.

La Glicoproteína Rica en Histidina (HRGP) es una glicoproteína de peso molecular 75 KD que se encuentra en plasma (Conc. plasmática: 1,8 μ M) y en las plaquetas. La glicoproteína rica en histidina se une al Plg a través del LBS del Kringle1 y por lo tanto es un inhibidor competitivo frente a la fibrina.

Fisiológicamente el 50% del plasminógeno circula complejoado en forma reversible a esta proteína, reduciendo la concentración plasmática de plasminógeno libre ^{29,127,128}.

El C1- Inhibidor es una glicoproteína con un peso molecular de 105 KD, compuesta por 478 aminoácidos. Presenta homología estructural con otras proteínas inhibidoras de serinoproteasas (serpinas).

Es el principal inhibidor de los factores XI y XII activados del sistema de coagulación y de las calicreínas. El C1 inhibidor reacciona, in vitro, con la plasmina y el t-PA lentamente por lo que la inhibición directa de plasmina o t-PA no tendría importancia a nivel fisiológico ¹¹¹.

1.2.5- MODULADORES DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLITICA

La lipoproteína a [Lp(a)] es una lipoproteína similar a lipoproteínas de baja densidad (LDL) cuyos niveles plasmáticos correlacionan con la enfermedad cardiovascular.

La Lp(a) se diferencia de la LDL por la presencia de la apolipoproteína a . Apo (a) es una lipoproteína plasmática de baja densidad constituida por un centro lipídico y dos subunidades proteicas, unidas por puentes disulfuros a y b. La subunidad a tiene alrededor de 37 copias del Kringle4 y una copia del Kringle5, ambos dominios Kringles tienen respectivamente 75-85% y 90% de homología estructural de los correspondientes Kringles presentes en el plasminógeno. Lp (a) tiene sitios de unión a lisina y por lo tanto podría interferir con las funciones del plasminógeno que están mediadas por esos kringles.

Si bien debido a las similitudes estructurales de la Lp(a) y el plasminógeno ; la Lp(a) podría interferir en la generación de plasmina, actualmente no hay consenso de la naturaleza de este efecto ¹²⁹.

Numerosos estudios in vitro han demostrado que la Lp (a) inhibe la activación de plasminógeno mediado por t-PA ^{130,131,132}; hallazgos recientes sugieren que altas concentraciones de t-PA superarían el efecto inhibitorio de la Lp(a) y activarían al

plasminógeno. Pacientes con altos niveles de Lp (a) no mostraron un incremento del riesgo trombótico.^{133,136}

A pesar de la controversia existente, la hipótesis que la Lp(a) modularía la fibrinólisis es atractiva y serán necesarios nuevos estudios para establecer el efecto de la Lp(a) sobre el sistema plasminógeno/plasmina.

La trombospondina forma parte de la familia de proteínas adhesivas. Es una glicoproteína de 3 cadenas que es secretada por los gránulos α plaquetarios cuando la plaqueta es estimulada por concentraciones de trombina menores que 199 ng/ml. La trombospondina interviene en el fenómeno de agregación plaquetaria mediando las interacciones celulares, células y célula matriz.

La trombospondina se une al plasminógeno, a la glicoproteína rica en histidina, in vitro y en ausencia de fibrina, la trombospondina acelera 30 veces la activación del plasminógeno por el t-PA; la trombospondina modularía la activación del plasminógeno mediada por t-PA por formación de un complejo ternario t-PA y fibrina^{137,139}.

La tetranectina es una proteína tetramérica de peso molecular 68 Kd que se encuentra en sangre y plaquetas. Su concentración plasmática es 0,2 μ M. La tetranectina se une in vitro al K4 del Plasminógeno favoreciendo la activación a plasmina mediada por t- PA.

La vitronectina, una glicoproteína adhesiva de 75 Kd, que interviene en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

Es una proteína ligante de PAI-1 en plasma, la unión del PAI a la vitronectina prolonga de 2 a 4 veces la vida media del inhibidor. (De clerck 1988).

La VN localizaría y concentraría la acción del PAI-1 a regiones específicas dentro de los tejidos¹⁰⁹, regulando de este modo la acción antifibrinolítica del PAI-1.

La endotelina-1 es un péptido vasoconstrictor aislado del sobrenadante del cultivo de células endoteliales de cordón umbilical. La endotelina disminuye la liberación de t-PA de las células endoteliales de cordón humano cuando son estimuladas por trombina. La endotelina actuaría como un regulador de la liberación de t-PA ¹⁴⁰.

I.3- EL SISTEMA FIBRINOLITICO: EL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA Y LA HEMOSTASIA:

El término hemostasia se refiere al conjunto de mecanismos y factores que permiten que la sangre fluya a través de los vasos sanguíneos manteniendo intacta la vasculatura. El mecanismo hemostático es responsable de formar el trombo hemostático cuando ocurre una lesión vascular, evitando una hemorragia excesiva, y de lisar el trombo removiendo los depósitos intravasculares de fibrina restablecer el flujo sanguíneo.

Los componentes del sistema hemostático son: factor vascular, factor plaquetario, sistema de coagulación, sistema plasminógeno/plasmina, sistemas enzimáticos plasmáticos (quininas, calicreínas, complementos) y factores reológicos.

Todos estos componentes están en un equilibrio dinámico y complejo; regulado por interacciones moleculares específicas entre el endotelio, las células sanguíneas, enzimas, cofactores, zimógenos e inhibidores presentes en el plasma o almacenados en distintas células. Cuando este equilibrio se ve perturbado puede dar origen a fenómenos hemorrágicos o trombóticos ¹⁴¹¹⁴².

I.3.1- SISTEMA DE COAGULACION

Cuando ocurre la ruptura del endotelio comienzan numerosos procesos tendientes a formar un coágulo y detener el sangrado. Los vasos sanguíneos se contraen; las plaquetas se adhieren, luego se agregan formando el tapón hemostático primario y liberan factores procoagulantes.

La célula endotelial y los monocitos exponen el factor tisular (TF), hoy señalado como principal iniciador del sistema de coagulación. El TF se une al factor FVII, éste se activa y se forma el complejo TF.FVIIa. El complejo TF.FVIIa activa el FX a FXa en presencia de membrana fosfolipídica y calcio; el complejo TF.FVIIa también activa al FIX a FIXa, que en presencia de VIIa genera más FXa. Este mecanismo de amplificación es necesario porque el FXa generado inicialmente se inhibiría rápidamente por el inhibidor fisiológico de la vía del factor tisular (Tisular factor pathway inhibitor) TFPI frenando la activación continua del Xa.

El factor Xa, en presencia de Va, fosfolípidos e iones Ca^{2+} transforman la protrombina a trombina. La trombina cliva al fibrinógeno originando fibrina soluble y activa el factor XIII a factor XIIIa y a los cofactores VIIIa, Va y VIIIa respectivamente (la activación de los cofactores constituyen un mecanismo de retroalimentación positiva del sistema de coagulación). El factor XIIIa, estabiliza la fibrina soluble a fibrina insoluble consolidando así el tapón hemostático.

Al producirse la injuria endotelial se activa el sistema de calicreínas/quininas, generando factor XI a factor XIa que actúa sobre el factor IX generando factor IXa. Este refuerzo en la generación de factor IXa a través del factor XIa, sería necesario en sitios del organismo donde la actividad fibrinolítica está aumentada, como lo demuestra la existencia de sangrado en encías que manifiestan los individuos deficitarios de XI^{143,144}.

El sistema de hemostasia está regulado fisiologicamente a tres niveles:

a) a nivel de las serinoproteasas activas, por los inhibidores de serinoproteasas (serpinas): Los factores de coagulación interactúan con las serpinas como sustratos suicidas. A este grupo de inhibidores pertenecen la antitrombina III (ATIII), el cofactor II de la heparina (HCII) y el C1-inhibidor. La antitrombina III, considerada el principal inhibidor fisiológico del sistema, inhibe trombina, F Xa, F IXa y F XIIa. La acción de la ATIII es potenciada in vivo por el heparán sulfato presente en el endotelio. La heparina, utilizada en la terapéutica anticoagulante, aumenta alrededor de 1000 veces la velocidad de reacción trombina-antitrombina. El cofactor II de la heparina inhibe sólo trombina y su potenciador el dermatán sulfato, se encuentra en la capa media de los vasos sanguíneos ^{145,146}.

b) A nivel de los cofactores del sistema de coagulación (FVIIIa y FVa): el sistema Proteína C/Proteína S que inhibe la acción de los factores VIIIa y Va. La trombina induce en la célula endotelial la exposición de trombomodulina, la PC se une a la trombomodulina y es activada a PC activada por trombina.

La PC activada en presencia de PS, factor V y membranas fosfolípicas inhiben a los factores Va y VIIIa. La proteína S también inhibiría factor Va en forma independiente ¹⁴⁷.

c) A nivel del complejo factor VIIa-TF: Por la acción de un inhibidor tipo Kunitz, denominado TFPI (tisular factor pathway inhibitor) liberado por distintas células. El TFPI tiene especificidad dual e inhibe primero al factor Xa y luego el complejo FXa-TFPI, inhibe al factor VIIa ¹⁴⁸.

Los inhibidores fisiológicos, que siempre están en exceso, son los responsables de mantener arrestado el sistema de coagulación; para que ocurra la formación del trombo se debe generar, en el sitio de la injuria, una cantidad de factores activados que supere a la concentración de inhibidores disponibles. Fisiológicamente continuamente se están generando pequeñas cantidades de trombina que son inhibidas por la antitrombina III, es decir que fisiológicamente hay un equilibrio

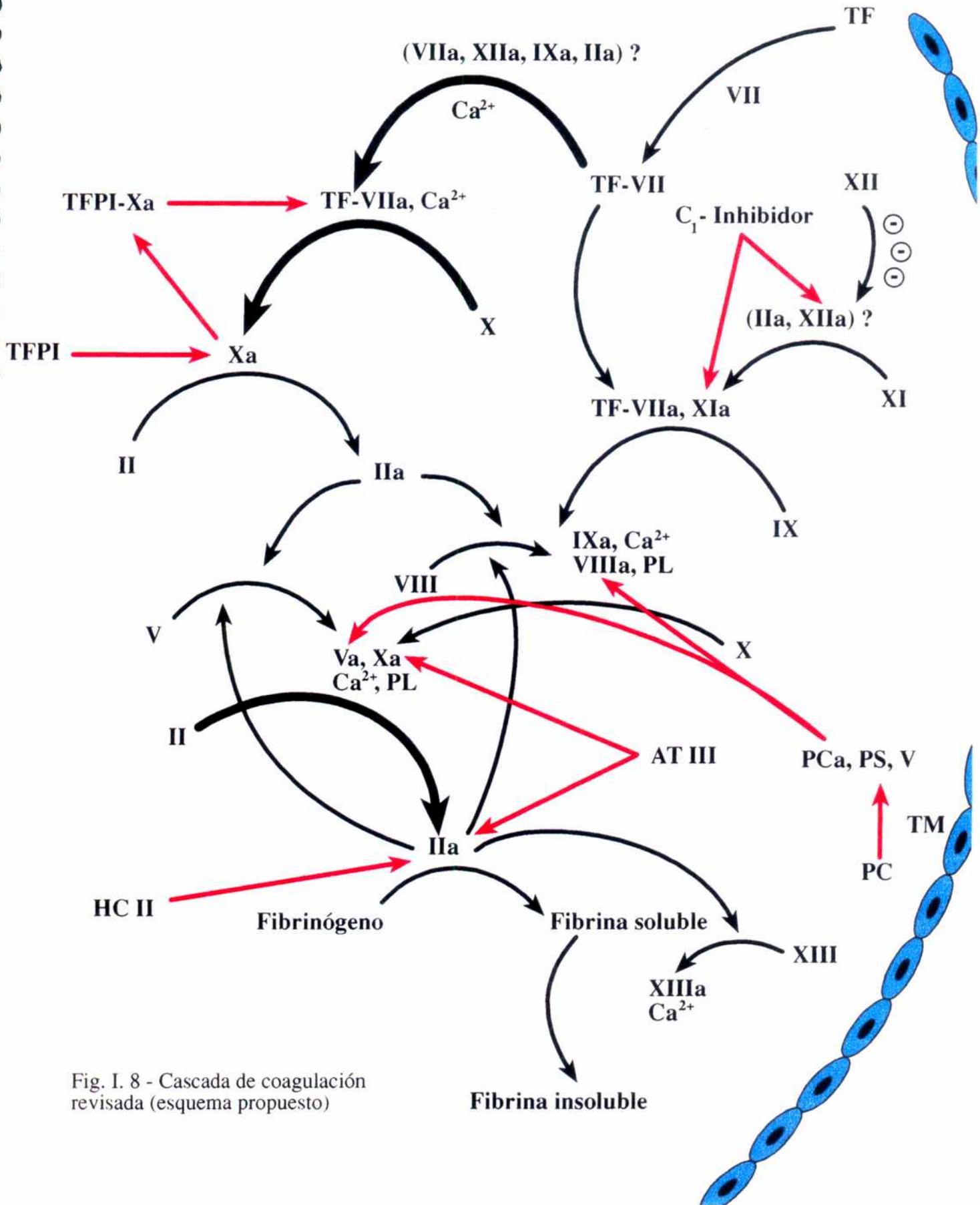


Fig. I. 8 - Cascada de coagulación revisada (esquema propuesto)

dinámico entre la generación y la inhibición de trombina o expresado en otros términos entre la activación e inhibición del sistema de coagulación.

I.3.2- FISILOGIA DE LA LISIS DEL COAGULO

El mecanismo fibrinolítico controla y limita la formación de fibrina intravascular y participa junto a neutrófilos y monocitos en la remoción del trombo. El inhibidor de los activadores del Plg-tipo 1 (PAI-1) ha sido postulado como el principal regulador fisiológico del sistema fibrinolítico in vivo.

Los diversos estudios realizados sobre el sistema fibrinolítico in vitro y en vivo y el advenimiento de los activadores recombinantes como agentes trombolíticos han permitido esclarecer hechos importantes en el mecanismo fibrinolítico. Debido a la ausencia de pacientes con deficiencias congénitas de los activadores fisiológicos y a las dificultades que se presentan para reproducir in vitro las interacciones que existen en un coágulo sanguíneo formado in vivo, es que son pocas las certidumbres acerca de las posibles interacciones dinámicas que ocurren in vivo entre la fibrina, los activadores e inhibidores fibrinolíticos, la célula endotelial y los leucocitos. Durante mucho tiempo se creyó que t-PA era el activador principal que intervenía en la remoción del coágulo. Sin embargo, la utilización de terapia trombolítica combinada con t-PA y u-PA recombinante en humanos y en modelos animales, han demostrado que ambos activadores tienen un efecto sinérgico en la trombolisis. Estudios con animales transgénicos sugirieron que tanto el t-PA como el u-PA contribuirían en prevenir la deposición de fibrina, durante los procesos de inflamación e injuria endotelial. El u-PA intervendría en la prevención de la deposición de fibrina, a través de una proteólisis plasminica asociada a células, pero aún no están esclarecidas las condiciones bajo las cuales el u-PA podría participar en la disolución del coágulo in vivo (Fig.I.8) ^{150,151}

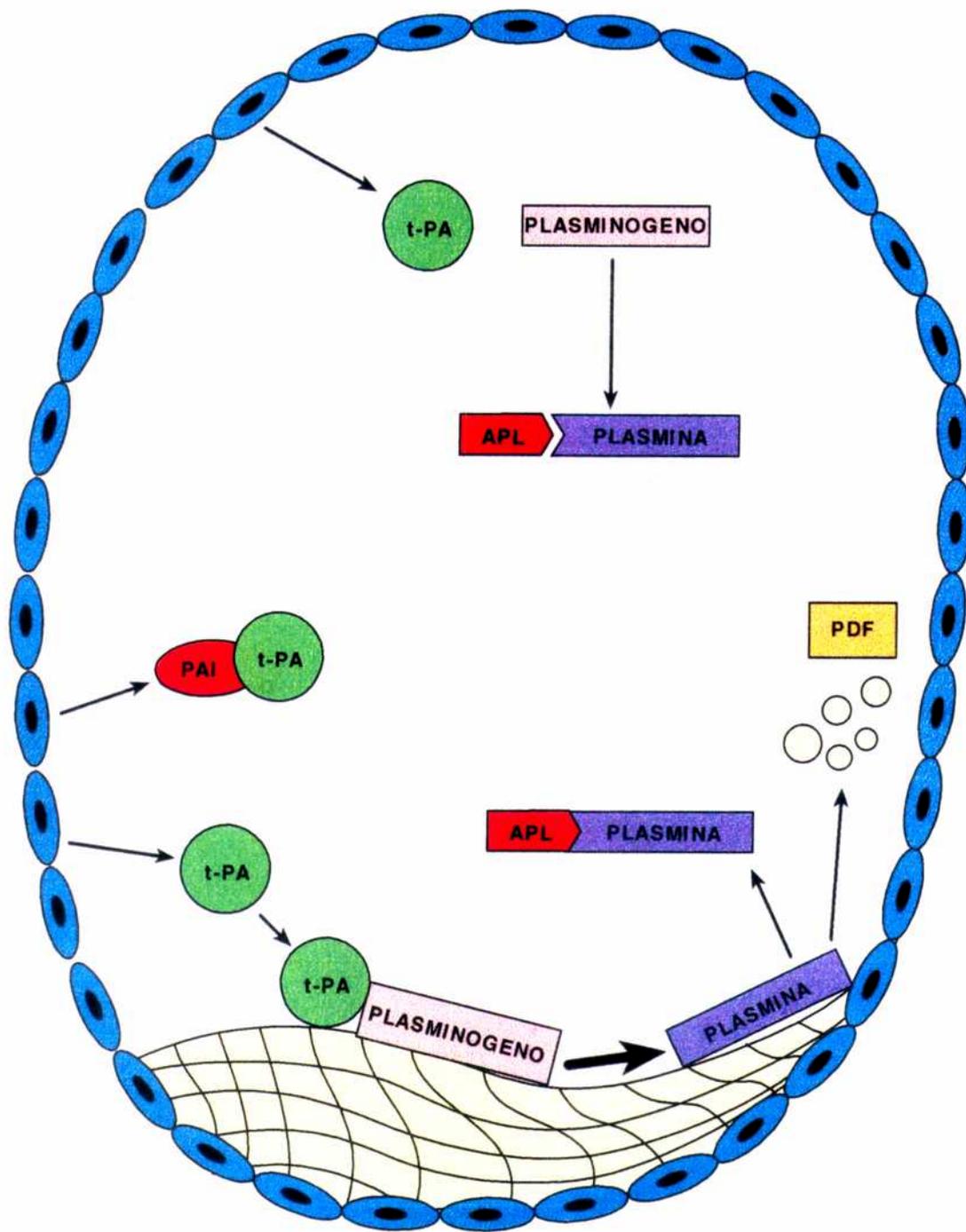


Fig. I. 9 - Lisis del coágulo de fibrina.

Se postula que durante la formación del coágulo el activador tisular del plasminógeno y el plasminógeno plasmático se adsorberían a la fibrina. La α_2 -antiplasmina también se uniría a la fibrina, por acción del factor XIIIa; este hecho aseguraría la estabilidad del tapón hemostático ya que la plasmina generada inicialmente sería inhibida por la α_2 -antiplasmina entrecruzada. La lisis del coágulo se iniciaría solamente cuando se generara una cantidad de plasmina que supere la concentración de la α_2 -antiplasmina entrecruzada al coágulo. Por otro lado la trombina, generada durante la activación del sistema de coagulación, y el éstasis venoso, originado por la oclusión del vaso sanguíneo, inducirían la liberación del t-PA y del scu-PA del endotelio. El t-PA liberado en las cercanías del coágulo, se uniría rápidamente a la fibrina, evitando ser inhibida por el PAI-1, liberado también por la célula endotelial estimulada.

El t-PA activaría al plasminógeno a plasmina a través de la formación de un complejo ternario y la plasmina formada comenzaría a degradar fibrina. Como consecuencia de esta proteólisis inicial se expondrían sitios adicionales de alta afinidad (sitios lisina carboxiterminal), para la unión de más plasminógeno. Este mecanismo constituye un “feed back” positivo para el sistema fibrinolítico y asegura la activación del plasminógeno localizado sobre el coágulo de fibrina. A medida que transcurre la degradación del trombo, la plasmina es liberada al plasma y es inhibida por la α_2 -antiplasmina.

La intensidad y la velocidad de la lisis del coágulo in vivo dependería de la orientación y la concentración de los agentes profibrinolíticos y antifibrinolíticos en la malla de fibrina y de la estructura, ancho y rigidez de las fibras de fibrina que forman el coágulo ^{51,53}.

I.3.3- HEMORRAGIA O TROMBOSIS: EL RESULTADO DE UN DESBALANCE HEMOSTATICO

La hemostasia es el resultado final de una serie de interacciones estrictamente reguladas. Pequeños cambios en algunos de los componentes hemostáticos pueden predisponer a manifestaciones hemorrágicas o trombóticas.

Los estados hemorrágicos pueden deberse a una hipocoagulabilidad ocasionada por una deficiencia, adquirida o hereditaria, de uno o más factores del sistema de coagulación o una activación excesiva del sistema fibrinolítico.

Los estados protrombóticos pueden deberse a una hipercoagulabilidad causada por una activación descontrolada del sistema de coagulación (déficit adquirido o hereditario de algún inhibidor fisiológico) o por disminución de la actividad fibrinolítica. Un individuo que presente un estado de hipercoagulabilidad, tendrá una mayor disposición a presentar eventos trombóticos cuando aparezca algún factor desencadenante (cirugía, embarazo, etc.). La magnitud del proceso trombótico dependerá de las causas que lo produjeron y del estado general del individuo.

I.3.3.1- HIPOFIBRINOLISIS Y TROMBOSIS

La actividad fibrinolítica neta en el torrente sanguíneo y en los tejidos, reflejan el balance entre los componentes profibrinolíticos (plasmina y activadores del plasminógeno), y los componentes antifibrinolíticos (α_2 -antiplasmina e inhibidores de los activadores de plasminógeno). Dado que el plasminógeno se encuentra en altas concentraciones en el plasma y en otros fluidos biológicos, la regulación del sistema fibrinolítico ocurre por el balance neto entre los activadores del plasminógeno (PA) y sus inhibidores (PAI).

Una actividad fibrinolítica disminuída está asociada a un aumento en el riesgo trombótico, pero la asociación entre y trombosis no ha sido confirmada por estudios. Los estados hipofibrinolíticos aparecen cuando hay niveles del plasminógeno funcionales y/o inmunológicos disminuídos, defectos en la síntesis o la liberación del activador tisular del plasminógeno o incremento en los niveles del PAI-1^{52,13}.

La deficiencia congénita de plasminógeno como causa de fenómenos trombóticos ha sido observada en pocos pacientes^{155,154}. Niveles del plasminógeno disminuídos se han observado en numerosos estados patológicos como enfermedad hepática, sépsis¹⁷ y la fiebre hemorrágica Argentina¹⁵⁶. Anormalidades en la molécula de plasminógeno llamadas displaminogenemias, impiden una activación efectiva del plasminógeno a plasmina, o dan origen, luego del proceso de activación a moléculas de plasmina inactivas. Los plasminógenos anormales Tochigi I, Tochigi II, Nogoya, Tokyo, Paris I y Frankfurt I presentaron una sustitución aminoacídica cercana al sitio activo; estos displaminógenos al ser activados generaban una plasmina incapaz de lisar fibrina. Los displaminógenos Chicago I, Chicago II y Chicago III no son activables a plasmina, por acción de los activadores del plasminógeno¹⁵⁵. En todas estas displaminogenemias, el propósito fue identificado luego de su primer evento trombótico, mientras que los miembros de las respectivas familias no habían sufrido manifestaciones trombóticas³⁹ a pesar de haber sido estudiados a edades avanzadas.

Si bien niveles disminuídos de t-PA han sido señalados como causa probable de hipofibrinólisis, hoy es aceptado que el PAI-1 es el principal regulador fisiológico del potencial de activación del sistema fibrinolítico¹⁵⁷.

En la mayoría de los pacientes con terapia trombolítica en los cuales ha sido detectado una hipofunción del sistema fibrinolítico, esta disminución estuvo relacionada a un incremento de PAI-1 más que a un descenso de los niveles de t-PA^{107,158}.

Sin embargo, todavía no ha sido fehacientemente establecido que un incremento de PAI-1 sea un factor independiente en el desarrollo de la trombosis venosa

profunda. Hay que tener presente que, a pesar de altos niveles de PAI-1, la trombosis se manifestaría clínicamente sólo cuando algún estímulo trombogénico apareciera. En estas condiciones los niveles incrementados de PAI-1 inhibirían la respuesta fibrinolítica normal, promoviendo la persistencia de la fibrina intravascular.

Por último, debe considerarse que el PAI-1 es un reactante de fase aguda, por lo tanto, el aumento podría deberse (y no ser la causa), a la trombosis venosa desarrollada previamente.

I.3.3.2- HIPERFIBRINOLISIS Y HEMORRAGIA

Una hiperfibrinólisis, debido a incremento en los niveles de t-PA o a una disminución de la α_2 -antiplasmina, podría inducir a manifestaciones hemorrágicas.

Pacientes con deficiencia congénita homocigota de α_2 -antiplasmina tienden a tener hemorragias severas. Las manifestaciones de sangrado se deberían a una lisis prematura del coágulo de fibrina debido a una mayor actividad plasmínica en ausencia del inhibidor. Existen 36 casos reportados de pacientes heterocigotas con deficiencia de α_2 -antiplasmina, todos con niveles funcionales y antigénicos del inhibidor entre 40 y 60% del valor normal (13/36 presentaron episodios hemorrágicos).

La deficiencia adquirida de α_2 -antiplasmina ha sido encontrada en pacientes con enfermedades hepáticas severas, coagulación intravascular diseminada y algunas enfermedades renales.

Existen sólo dos casos reportados en la literatura, donde se ha encontrado un aumento de actividad fibrinolítica, por un incremento hereditario de los niveles de t-PA^{157,158,159}. Estos pacientes presentaron acortamiento en los tiempos de lisis de las englobulinas, pero las manifestaciones de sangrado ean esporádicas.

I.4- EL SISTEMA PLASMINOGENO/PLASMINA EN OTROS PROCESOS BIOLÓGICOS

El sistema plasminógeno/plasmina, además de actuar como sistema fibrinolítico, interviene en numerosos fenómenos biológicos: la reparación tisular, ovulación, implantación embrionaria, embriogénesis¹⁶⁰ remodelación de la matriz extracelular^{161,162} invasión tumoral y metástasis^{163,164}. El sistema Plg/Plm podría también estar involucrado en las funciones del cerebro, ya que se ha detectado la exposición de componentes fibrinolíticos en áreas especializadas del cerebro durante el desarrollo.

El sistema Plg/Plm debe ser considerado como un sistema de proteólisis extracelular, regulado y localizado precisamente, a través de la síntesis y secreción de los activadores e inhibidores del plasminógeno. Diversos estudios, in vitro, han demostrado la intervención del sistema Plg/Plm en diversos procesos biológicos sin embargo no se ha demostrado su importancia fisiológica cuando dichos procesos ocurren in vivo⁵⁵.

I.4.1- REMODELACION TISULAR

La degradación de la matriz extracelular y de las membranas basales es necesaria en todo proceso de remodelación tisular. Las tres principales metaloproteasas (MP) que participan en la degradación de las proteínas de la matriz extracelular son: colágeno, melisina y gelatinasa, que son secretadas en forma de zimógenos por las células del tejido conectivo.

La plasmina degrada la matriz extracelular y transforma a las MP en la forma activa. Los activadores de Plg tipo uroquinasa actuarían sobre algunas proteínas de la matriz y originarían una proteólisis pericelular independiente de plasmina^{161,162}.

El sistema plasminógeno/plasmina también intervendría en la remodelación de la médula durante el crecimiento y la edad adulta. Las colagenasas latentes serían activadas por proteólisis plasmínica promoviendo así la migración de los osteoblastos y facilitando la reabsorción medular. Estudios en ratones transgénicos deficientes en t-PA ó u-PA, han revelado que el sistema plasminógeno/plasmina no es imprescindible para la remodelación normal de la médula⁵⁵.

I.4.2- OVULACIÓN

El sistema plasminógeno/plasmina intervendría en la remodelación tisular que tiene lugar durante la formación de los folículos preovulatorios y proveería una proteólisis selectiva y direccional durante la ruptura de los folículos, en el ovario humano.

El t-PA es el activador del plasminógeno predominante en los folículos preovulatorios de ratas estimuladas con gonodotrofinas.

Estudios in vivo en ratas demostraron que la actividad de t-PA era baja previa a la ovulación, aumentaba luego de la estimulación con gonadotrofinas en la ovulación y disminuía luego de producida la ovulación. El comportamiento de la actividad del PAI-1 fue inverso al del t-PA.

Estudios con ratones transgénicos han demostrado que la ovulación inducida por gonadotrofinas, puede ocurrir en ausencia de t-PA, u-PA, PAI-1 o α_2 -macroglobulina, pero se encuentra reducida en ratones con deficiencia combinada de u-PA y t-PA⁵⁵.

Hasta el momento se puede afirmar que el sistema Plg/Plm está involucrado en diversas funciones en el ovario, pero son necesarios más estudios para esclarecer la importancia relativa de los distintos componentes del sistema Plg/Plm en estos procesos.

I.4.3- ANGIOGENESIS

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos capilares sanguíneos, a partir de vasos preexistentes.

Una degradación proteolítica controlada de la degradación de la matriz extracelular sería necesaria y reflejaría un balance entre los activadores del sistema fibrinolítico y sus inhibidores. El factor fisiológico para la angiogénesis y el factor de crecimiento β (TGF β), moduladores de la participación de la célula endotelial en la angiogénesis, inducen la liberación de t-PA y u-PA.

Modelos experimentales, usando monocapas de células endoteliales discontinuas, han demostrado que las células secretan u-PA hasta que se genera una monocapa continua. La proteólisis plasmínica, jugaría un rol más importante en la reendotelización o reangiogénesis en un proceso inflamatorio o luego de una injuria endotelial que durante el proceso normal de formación de capilares sanguíneos.

I.4.4- PROCESOS PROLIFERATIVOS

La proteólisis plasmínica pericelular facilitaría la migración de las células a través de barreras anatómicas, por degradación de los constituyentes de la matriz extracelular.

La expresión de u-PA, u-PAR y PAI-1 está aumentada en las células tumorales y en el estroma que las circunda^{163,164}. Diversos componentes del sistema fibrinolítico han sido sugeridos como marcadores pronósticos de algunos tumores en el hombre.

En carcinomas humanos de colon y próstata existe una correlación entre la expresión de u-PA y la agresividad del tumor y progresión clínica de la enfermedad¹⁶⁷.

En modelos experimentales se ha comprobado que la invasión de las células tumorales en embriones de pollo está reducida cuando se inhibe la producción o la actividad de u-PA¹⁶⁸. Otros autores utilizando diversas líneas celulares, han encontrado que la agresividad del tumor correlaciona no sólo con la expresión del u-PA sino también con la del t-PA.

I.4.5- ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias musculares medianas y grandes, y de arterias elásticas, en la cual hay una pérdida de la elasticidad de los vasos arteriales. Existen dos formas de lesiones ateroscleróticas: la placa lipídica y la placa fibrosa, característica de la aterosclerosis senil. La placa fibrosa consiste en una core necrotico compuesto por células espumosas cubiertas por macrófagos, células del músculo liso, colágeno, elastina y proteoglicanos^{169,170}. El ateroma asintomático es un sitio donde hay sustancias procoagulantes que podrían conducir a la trombosis. Numerosos estudios epidemiológicos, genéticos y moleculares asocian un estado hipofibrinolítico con el desarrollo y/o el progreso de la aterosclerosis (38-40), sugiriendo que una deficiencia en la generación de plasmina podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan la lipoproteína Lp(a), han demostrado una disminución de la generación de plasmina en los vasos ateroscleróticos. El análisis de arterias humanas ateroscleróticas revelan la presencia de PAI-1 en la placa ateromatosa¹⁶⁶. La presencia de altos niveles de PAI-1 dentro de la placa ateromatosa podría inhibir la generación de plasmina y por ende la degradación de la matriz extracelular contribuyendo a estabilizar de esta forma la lesión. La magnitud y la forma en que el sistema fibrinolítico podría afectar las lesiones ateroscleróticas aún no están bien establecidas.

II- LAS ENZIMAS LEUCOCITARIAS

II.1- POLIMORFONUCLEAR NEUTROFILO

Los leucocitos son elementos nucleados morfológica y funcionalmente heterogéneos presentes en la sangre, su medio de tránsito desde los órganos que los generan hasta los espacios celulares donde cumplen su rol fisiológico. Los diversos tipos de leucocitos se encuentran en la sangre periférica en concentraciones diferentes y relativamente constante, resultado de un equilibrio dinámico entre los leucocitos que se incorporan y los que abandonan permanentemente el sistema circulatorio. Bajo condiciones de relajación física y mental el nivel basal de leucocitos es $5,0$ a $7,0 \times 10^9$ células/litro ¹⁷¹. El nivel de leucocitos aumenta ligeramente hacia el atardecer, con la radiación solar intensa, durante la ovulación y el embarazo. El ejercicio extremo origina una marcada leucocitosis de valores hasta $22,0 \times 10^9$ células/litro, especialmente por incremento de los leucocitos neutrófilos.

Los leucocitos se clasifican en linfocitos (y sus derivados, las células plasmáticas), los monocitos y los granulocitos, denominados así por la presencia de gránulos en su citoplasma. Los granulocitos, se designan como neutrófilos, eosinófilos y basófilos según las características tintoriales de sus gránulos. Se denominan polimorfonucleares (PMN) a los granulocitos en el estadio más maduro, en el cual el núcleo está polilobulado. Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos tienen perfiles similares de proliferación, diferenciación, maduración, almacenamiento medular y liberación a la sangre y tienen una célula troncal común, la CFU_{NM} donde los tres primeros estadios constituyen el comportamiento mitótico y los tres últimos el comportamiento madurativo. Los estadios del proceso de proliferación y maduración de los granulocitos son: Mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, células en cayado y PMN maduro. Diversos factores humorales, denominados factores de

crecimiento hemopoyético, regulan la actividad proliferativa de las células progenitoras de granulopoyesis.

En la regulación de la mielopoyesis intervienen principalmente la interleukina 3, el GM-CSF, G-CSF y el M-CSF. Para conservar la mielopoyesis dentro de los límites fisiológicos existen también diversos inhibidores, como son la PGE2 y la isoferitina, que actúan mediante mecanismos de retroalimentación negativa.

Las características principales de cada estadio celular están resumidas en la tabla II.1. Hay que tener en cuenta que las definiciones morfológicas para diferenciar los estadios celulares son arbitrarias y no siempre concuerdan con los cambios bioquímicos o funcionales, ocurridos a nivel celular.

Durante el estadio promielocítico aparecen y se acumulan los gránulos llamados no específicos, azurófilos o primarios, que permanecen en el PMN maduro. En el estado mielocito aparecen los gránulos específicos o secundarios. El contenido de gránulos primarios del mielocito es menor que el de gránulos secundarios, ya que los gránulos azurófilos se forman sólo en el promielocito y se reparten equitativamente entre las células resultantes de sucesivas divisiones mitóticas. En el neutrófilo maduro, estadio final del proceso de maduración, la relación $G_{\text{azurófilos}}/G_{\text{secundarios}}$ es 1, 2 o 3¹⁷³.

La microscopía electrónica permite diferenciar las tres series granulocíticas, neutrófilas, eosinófilas y basófilas, por la estructura fina de los gránulos azurófilos a partir del estadio promielocítico; en cambio por microscopía óptica las series granulocíticas sólo pueden diferenciarse a partir del estadio mielocítico.

A medida que las células maduran se produce progresivamente reducción del tamaño celular, condensación cromatínica y lobulación nuclear progresiva; cambios en la composición bioquímica del citoplasma, de la membrana celular de los gránulos y un aumento en las capacidades funcionales de los granulocitos¹⁷².

Tipo de tamaño		Núcleo			Citoplasma			
Célula	(μ M)	Posición	Forma/ Color	Cromatina	Nucleado	Cantidad Relativa	Color	Gránulos
Granulocitos								
Mieloblasto	10-8	Excéntrica o Central	Redondo u oval/Púrpura	Fina	2-5	Escasa	Azul	Ninguno
Promielocito	12-20	Excéntrica o Central	Redondo u oval/Púrpura suave	Fina	2-5	Moderada	Azul	Primarios
Mielocitos	12-18	Excéntrico	Oval Púrpura	Fina	Raros	Moderada	Rosa Azulado	Primarios Secundarios (en neutrófilos)
Metamielocitos	10-18	Central o Excéntrica	Herradura Púrpura Azulado	Distingue basi y oxi- cromatina	Ninguna	Abundante	Rosa	Neutrófilo Cosinófilo Basófilo
Cayado	10-10	Central o Excéntrica	Form a de banda Púrpura Azulado	Distingue Basi y oxi- cromatina	Ninguna	Abundante	Rosa	Neutrófilo Cosinófilo Basófilo
Polimorfonuclear								
Neutrófilos	10-15	Central o Excéntrica	2-5 lóbulos Púrpura Azulado	Densa	Ninguna	Abundante	Rosa Pálido	Finos Rosas o Violetas
Eosinófilos	10-15	Central o Excéntrica	2-3 lóbulos	Densa	Ninguna	Abundante	Rosa Pardo	Grandes Numerosas Uniformes
Basófilos	10-15	Central	2-3 lóbulos Púrpura Azulado	Densa	Ninguna	Abundante	Rosa	Grandes Espesos Oscuros

Tabla II.1- Características de los distintos estadios celulares de los leucocitos.
(Tinción May Grünwald-Giemsa)

El neutrófilo maduro, denominado polimorfonuclear, el leucocito más abundante en circulación, es una célula pequeña con volumen de 600f, con núcleo lobulado, cromatina condensada, escasas mitocondrias, gránulos citoplasmáticos, alto contenido de glucógeno, y diversas proteínas de membrana y citoplasmáticas comprometidas en la funcionalidad celular.

La función principal de granulocito neutrófilo es prevenir o retardar la acción de agentes infecciosos u otro material extraño al huésped. Para cumplir su rol, el neutrófilo tiene capacidad de movilidad, de adhesión celular, fagocítica y bactericida.

La población de neutrófilos de un individuo es heterogénea en cuanto al desarrollo de cada una de las funciones señaladas. No está plenamente establecido si la heterogeneidad encontrada indica, subpoblaciones verdaderas provenientes de precursores celulares distintos, diferencias de maduración o influencias del microambiente celular ¹⁷⁴.

La membrana del neutrófilo no expresa antígenos ABO ni los antígenos de Clase II del sistema HLA. Esta membrana contiene receptores para factores quimiotácticos (péptidos N-formilados, leucotrienos B-4), para factores opsonizantes (región Fc de las inmunoglobulinas IgG1 y de Ig G3, C3b y C3bi) y para diversos mediadores celulares que modulan su acción (Il-1, TNF, GM-CSF, G-SCF, factor activador de plaquetas y agentes adrenérgicos). La unión del ligando al receptor induce cambios en el citoesqueleto plasmático, que producen la extensión de pseudópodos en un proceso mediado por proteína G y fosfatidilinositol.

En la membrana también se encuentran tres receptores glicoproteicos, denominados Mac-1, LAF-1 y p150,95 que son exclusivos de los leucocitos y que intervienen en la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales humanas. La membrana del neutrófilo también presenta citocromo b558 y una flavoproteína asociada; diversas fosfolipasas y proteínas Na/K-APTasa y Ca/Mg-ATPasa que actúan como canales y bombas de iones.

En el citoplasma del neutrófilo se encuentra actina, miosina y diversas proteínas ligadoras de actina que intervienen en la movilidad. fagocitosis y degranulación del

neutrófilo. En el citosol se encuentran distintas cantidades de enzimas que actúan en los diversos ciclos metabólicos, agentes oxidantes (dismutasa, catalasa, glutatión, peroxidasa, reductasa) y glucógeno como fuente energética en situaciones de anaerobiosis. La naftol-D-clorocetato estereasa, es una enzima citoplasmática presente sólo en neutrófilos y sus precursores ¹⁷⁴.

II.1.1- GRANULOS DE NEUTROFILO:

En el neutrófilo existen al menos tres clases de gránulos que difieren en su contenido y cuya secreción estaría controlada por mecanismos diferentes ^{173,175} :

- * Gránulos primarios o azurófilos
- * Gránulos secundarios o específicos
- * Gránulos terciarios

Los gránulos primarios o azurófilos son empacados y liberados desde el interior de la superficie cóncava del aparato de Golgi, en el estado promielocítico. Contienen estructuras cristalinas centradas que unen colorante rojo neutro apareciendo como cuerpos rojos en las preparaciones supravitales.

Ellos son esencialmente lisosomas unidos a membranas que contienen distintas enzimas: peroxidasa, elastasa, catepsina G, estearasa, β glucoramidasa, β -galactosidasa, α manosidasa, lisozimas y otras proteínas básicas. La mieloperoxidasa es la enzima que se utiliza habitualmente como marcador de granulación primaria. Los gránulos azurófilos contienen componentes que ejercen funciones microbicidas tras su expulsión del fagosoma; la fagocitosis estimula la secreción de los gránulos. La estimulación del neutrófilo, pretratado con citocolasina β o lipopolisacáridos bacterianos, complejos inmunes, factores quimiotácticos, ésteres de forfol e ionóforos de calcio, producen la degranulación in vitro de los gránulos secundarios primero y luego de los azurófilos. La monosina, un ionóforo de calcio y la nigericina, un ionóforo de K, inducirían la secreción selectiva de los gránulos primarios ¹⁷⁶.

Los gránulos secundarios o específicos son más pequeños que los primarios. Se forman y son liberados del exterior de la superficie convexa del aparato de Golgi en los mielocitos.

Los gránulos secundarios contienen aminopeptidasa, lisozima, colagenasa, lactoferrina, proteína ligante de B12, transcobalaminas y una variedad de proctinas básicas. La presencia de fosfatasa alcalina en los gránulos secundarios es controversial. La lactoferrina y la proteína ligante B12, son las proteínas marcadoras de degranulación de gránulos secundarios.

Los componentes de los gránulos secundarios ejercen funciones degradativas en el fagosoma, generan péptidos de acción quimiotáctica y facilitan la iniciación de los procesos reparativos. Las funciones que pueden corresponder a la lactoferrina y a la proteína ligadora de B12 no están bien establecidas; es probable que ejerzan efectos bacteriostáticos e intervengan en la regulación de la granulopoyesis.

Los gránulos secundarios secretan su contenido cuando el neutrófilo es estimulado por agentes quimiotácticos, ésteres de forbol e ionóforos de calcio. El citocromo b y una flavoproteína presentes en la membrana del gránulo son responsables del fenómeno de la explosión o estallido respiratorio.

Los gránulos terciarios aparecerían en los estadios de metamielocitos y neutrófilos en cayados, contienen gelatinasa, catalasa, ubiquinona y fosfatasa alcalina leucocitaria. Algunos investigadores sugieren que los gránulos terciarios no serían tales, sino serían solo variaciones de los gránulos primarios y secundarios.

La función principal de las enzimas leucocitarias liberadas durante la degranulación es bactericida; este mecanismo, mediado por las enzimas degradativas, es también eficaz en anaerobiosis. El proceso de degranulación ocurre una vez que la

partícula extraña ha sido internalizada, por fusión de los gránulos lisosomales con el fagosoma. El contenido de los gránulos específicos es liberado primero dentro del fagosoma y es independiente de la degranulación posterior de los gránulos azurófilos.

La fusión del lisosoma y la membrana celular estaría mediada por microtúbulos y es independiente del metabolismo oxidativo del neutrófilo. Si bien la fusión de los lisosomas con el fagosoma ocurre intracelularmente, por lo general parte del contenido lisosomal es liberado al medio extracelular por degranulación prematura (fenómeno de regurgitación) durante la alimentación. Una degranulación extracelular excesiva puede lograrse tratando los neutrófilos con citocalasina B; en esta situación las células liberan el contenido de los gránulos al medio extracelular cuando son estimulados a nivel de membrana ¹⁷⁶.

Las enzimas liberadas también pueden actuar sobre estructuras tisulares al resultar expulsadas en el espacio tisular, por mecanismos de exocitosis o por mecanismos no asociados con la fagocitosis. Las proteasas neutras, elastasa, colagenasa y catepsina G, cuando son liberadas extracelularmente y superan la capacidad inhibitoria de las antiproteasas plasmáticas, degradan una amplia gama de sustratos biológicos produciendo un incremento en la respuesta inflamatoria.

Existen diversas sustancias que inducen la degranulación in vitro, muchas de las cuales están presentes normalmente en el plasma y aumentan en aquellos pacientes con alteraciones neutrófilas; estos hechos sugieren que el neutrófilo tendría in vivo funciones no sólo fagocíticas ¹⁷¹¹⁷⁷ sino también secretorias.

II.1.2- DISTRIBUCION DE LOS NEUTROFILOS

Los leucocitos se producen continuamente en cantidades relacionadas con el nivel de demanda del organismo, procurando protegerlo de agresiones físicas, químicas y microbiológicas y participando en la regeneración de las lesiones.

En condiciones basales el tiempo de tránsito medular desde el estadio de mieloblasto hasta el acceso del granulocito neutrófilo a la sangre circulante, es de 7 a 11 días. Una vez maduros los neutrófilos pasan de la médula a la sangre periférica. La cantidad de neutrófilos que entra en el compartimiento intravascular es del orden de 1.63×10^9 células kg/día. La reserva celular del compartimiento medular postmitótico es alrededor de 12-14 veces los neutrófilos circulantes. Los neutrófilos del compartimiento intravascular están repartidos en dos subcompartimientos que coexisten en un equilibrio dinámico: un pool de neutrófilos circulantes y (neutrófilos marginados) un pool marginal. El pool marginal está constituido por los neutrófilos que se mantienen fijos a capilares marginales y en los sinusoides esplénicos. En un hombre normal los neutrófilos están en un equilibrio constante entre los dos compartimientos y los pools son casi de igual tamaño. Las alteraciones de este equilibrio son la respuesta inicial a las agresiones en el organismo o a diversos estímulos fisiológicos¹⁷¹¹⁷².

El tiempo medio de permanencia de los neutrófilos en el compartimiento intravascular es de alrededor de 10 horas, es decir que hay alrededor de dos renovaciones diarias del contenido total de neutrófilos. Los neutrófilos del pool marginal acceden a los espacios tisulares por diapedesis entre las células endoteliales de las vénulas post capilares sin orden cronológico y probablemente sin retorno a la circulación. El tiempo que está el neutrófilo en el compartimiento tisular es alrededor de 4 días, luego son destruidos.

La determinación del número de neutrófilos realizada sobre una muestra sanguínea obtenida por punción venosa refleja la cantidad de células en el subcompartimiento circulante. El número de neutrófilos en circulación puede aumentar (granulocitosis neutrófila o neutrofilia) por movilización de elementos del compartimiento marginal y/o bloqueo de la emigración a espacios tisulares (ocurren durante el ejercicio físico o y estrés). La disminución de la concentración de neutrófilo en sangre (neutropenia) puede deberse al aumento del pool marginal o al déficit absoluto o parcial de regeneración medular.

II.1.3- FUNCION DE LOS GRANULOCITOS NEUTROFILOS

La función principal de los granulocitos neutrófilos es la fagocitosis de los agentes infecciosos y/o materiales extraños presentes en el organismo.

Para lograr cumplir su rol, los neutrófilos deben acumularse en el lugar de la inflamación (presencia del agente extraño), fagocitarlo y digerirlo mediante la acción de las enzimas lisosomales. Esta secuencia fue descrita por primera vez por Metchnikoff¹⁷⁸. Actualmente se acepta que la defensa del organismo se da a través de factores fagocíticos (neutrófilos, macrófagos) y factores plasmáticos (anticuerpos), en eventos asociados de una forma extraordinariamente compleja.

II.1.3.1- QUIMIOTAXIS Y MOVIMIENTO CELULAR

La capacidad de acumulación de los neutrófilos en el lugar de la injuria depende de la capacidad de movimiento y de la orientación direccional en respuesta a los estímulos quimiotácticos. La quimiotaxis está mediada por dos caminos: a) los citoantígenos, aquellas sustancias que generan factores quimiotácticos al interactuar con el suero, componentes del complemento, mastocitos o linfocitos sensibilizados (ejemplos de citoantígenos son complejos Ag-Ac, endotoxina, ciertas bacterias, algunas enzimas que reaccionan con las proteínas del complemento y lisosomas de los neutrófilos) y b) citotoxinas, que son sustancias que actúan directamente sobre los neutrófilos (por ejemplo, productos de bajo peso molecular del complemento, C5a)

Los agentes quimiotácticos de mayor relevancia biológica son C5a, oligopéptidos N-formilados (FMLP) derivado de las bacterias, leucotrienes B4; CCF (factor

producido por los neutrófilos cuando ingieren cristales) y el factor de activación plaquetario.

Los factores quimiotácticos tienen receptores en membrana y la unión ligando receptor inicia una serie de eventos bioquímicos y celulares que incluyen cambios en el potencial de membrana y en el flujo de iones, polarización morfológica de la célula, locomoción, secreción del contenido granular y producción de superóxido.

Para la migración de los neutrófilos es esencial su adherencia a las células endoteliales, proceso Mg^{2+} dependiente y mediado por dos moléculas de adhesión intercelular, ICAM-1 y ELAM-1, presentes en la célula endotelial activada y la expresión del CD11b/CD18 en el neutrófilo¹⁷¹¹⁷⁴.

II.1.3.2- FAGOCITOSIS Y DEGRANULACION

El neutrófilo fagocita sólo aquellas partículas que presente en su superficie distintas opsoninas (inmunoglobulinas, fracciones de complemento, lectinas, fibronectina) para las cuales el neutrófilo tiene receptores de membrana. La interacción ligando-receptor favorece la emisión de un pseudópodo por el contacto con la partícula, de modo que la misma resulta progresivamente englobada e internalizada.

Luego que el fagosoma es internalizado se produce rápidamente la fusión con los lisosomas secundarios y primarios y también se produce la liberación de las diversas enzimas hidrolíticas, digestivas y sustancias antibacterianas en la vacuola fagocítica. Luego de la fusión la bacteria es muerta y el material resultante es digerido. El proceso de fagocitosis transcurre con un aumento de la glucólisis y de la síntesis de lípidos de membrana en la célula bactericida.

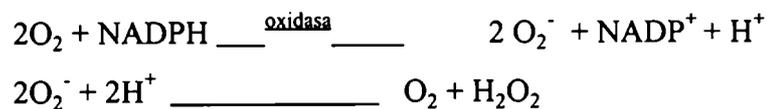
II.1.3.3- ACCION MICROBICIDA

El neutrófilo tiene dos sistemas antimicrobianos, uno dependiente y otro independiente de oxígeno. Existen dos mecanismos oxígeno dependientes, uno mediado por la mieloperoxidasa y otro en el que intervienen H_2O_2 , anión superóxido, radicales hidroxilos y oxígeno singulete.

El mecanismo oxígeno dependiente, asociado con el “estallido respiratorio” mediado por mieloperoxidasa, es el de mayor importancia en el ataque bacteriano.

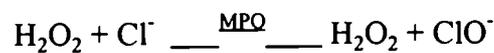
El término “estallido respiratorio” se refiere a cuatro eventos metabólicos que ocurren cuando el neutrófilo es estimulado apropiadamente: un aumento en el consumo de O_2 , producción de superóxido (O_2^-), producción de H_2O_2 y oxidación de la glucosa vía el camino de las hexosas monofosfatos.

Una oxidasa en la membrana del fagosoma actúa sobre el O_2 generando O_2^- , y $NADP^+$



El H_2O_2 , no sería un agente bactericida per se, sino que sería sustrato de la mieloperoxidasa (MPO) una enzima abundante en los gránulos azurófilos.

La mieloperoxidasa en presencia de haluros genera hipoclorito.



La combinación $MPO/H_2O_2/Cl^-$ es eficiente para matar bacterias en concentraciones de H_2O_2 tan bajas como $10\mu M$, en cambio en ausencia de MPO son necesarios niveles de H_2O_2 de 0.5 mM o mayores para lograr el mismo efecto.

El mecanismo oxígeno dependiente, pero independiente de mieloperoxidasa, sería importante, en pacientes con deficiencia de MPO; esto explicaría por qué sólo de 1 al 5% de los pacientes deficientes en MPO tienen mayor susceptibilidad a las infecciones.

Los sistemas bactericidas independientes de oxígeno están mediados por lisozima, lactoferrina, proteínas catiónicas, defensinas y proteasas neutras. El aumento de la concentración de protones que ocurre en el fagosoma ha sido sugerido como causa de muerte de algunas bacterias.

La lisozima es una proteína básica de 145 kD, capaz de hidrolizar las paredes celulares de algunas bacterias produciendo su muerte. Otras bacterias son resistentes a la lisozima pero se sensibilizan luego de ser expuestas al H_2O_2 y al ácido ascórbico.

La lactoferrina es una proteína bacteriostática presente en los gránulos específicos. Inhibe el crecimiento bacteriano porque se une al hierro, un nutriente esencial para el microorganismo.

Algunas proteínas catiónicas son muy activas frente a microorganismos Gram positivos, pero no lo son frente a organismos Gram negativos. La electroforesis del extracto de gránulos azurófilos humanos presenta distintas proteínas catiónicas. Todas exhiben una actividad enzimática similar a la quimiotripsina pero su acción microbicida sería independiente de esta actividad. Se ha sugerido que actuarían como sales amonio cuaternario interaccionando con la membrana lipídica del microorganismo.

Las defensinas son polipéptidos catiónicos que exhiben actividad bactericida contra bacterias, hongos y virus. Están presentes en gránulos azurófilos o en microgránulos separados.

Luego de haber dado muerte a la bacteria, se produce la digestión por acción de las enzimas hidrolíticas ácidas liberadas al fagosoma desde los gránulos primarios y la liberación del material digerido. Algunas bacterias como la pneumococci son digeridas lentamente; el material no digerido queda en el citoplasma del neutrófilo como mielina. Si la acción bactericida del neutrófilo no fue exitosa, el

microorganismo podría multiplicarse y matar al neutrófilo, eludiendo el mecanismo de defensa.

En algunas circunstancias (ingestión de cristales de ácido úrico o de hidroxipatita, liberación de endotoxinas bacterianas) se podría romper la pared del fagosoma y liberar, al medio extracelular, el contenido de las enzimas hidrolíticas donde podrían causar daño tisular y ser el comienzo de una reacción inflamatoria secundaria¹⁷¹¹⁷⁴.

II.2- PROTEASAS DEL NEUTROFILO

Las proteasas neutras, pertenecientes a la familia de las quimiotripsinas, elastasa, proteinasa 3 y catepsina G son las constituyentes principales de los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Estas serinopeptidasas comparten sustratos biológicos por los que se denominan en conjunto *enzimas simil elastasa* (enzimas elastase like). Otra endopeptidasa neutra, la colagenasa está en los gránulos secundarios.

La unidad catalítica esencial de estas endopeptidasas neutras es una cadena polipeptídica de alrededor de 220 residuos aminoacídicos con un sitio activo formado por la tríada catalítica His-Asp-Ser, característica de las serinoproteasas.

Fisiológicamente las proteasas leucocitarias intervienen en la destrucción de los microorganismos fagocitados. Cuando las proteasas son liberadas total o parcialmente al medio extracelular por exocitosis de los gránulos, la elastasa y la proteinasa 3 clivan elastina; la elastasa y la catepsina G atacan proteoglicanos denudando al colágeno que es luego degradado por la colagenasa. En resumen, las proteasas participan activamente en la remodelación tisular. La actividad enzimática extracelular de estas serinoproteasas está controlada fisiológicamente por un grupo de inhibidores de proteasas, siendo la α_1 -proteínasa inhibidor (α_1 -PI) o α_1 -antitripsina el inhibidor de mayor concentración en el plasma humano. Las secreciones de mucus, el líquido seminal humano y el fluido bronquial contienen inhibidores de

serinoproteasas de bajo peso molecular (alrededor de 11 kD) denominados leucoproteasas¹⁷⁹.

Cuando las proteasas neutras presentes en el medio extracelular sobrepasan la capacidad inhibitoria de las antiproteasas plasmáticas, ya sea por exocitosis extracelular excesiva (sepsis, leucemia) o disminución de los inhibidores (efisema pulmonar), producen daño tisular y la aparición de una respuesta inflamatoria. Estas proteasas leucocitarias y en especial la elastasa, han sido señaladas como las principales responsables del daño tisular observado en los procesos inflamatorios.

Estas proteasas neutras no inhibidas tienen acción proteolítica sobre los sistemas plasmáticos de coagulación, fibrinólisis, complemento y de calicreína-quininas. El daño de la matriz extracelular irreversible, la activación de los diversos sistemas plasmáticos de proteasas y la presencia de diversos agentes quimiotácticos, alguno de ellos generados por la acción de las propias enzimas leucocitarias (ejemplo elastina), atraen neutrófilos al sitio de la injuria amplificando la magnitud de la respuesta inflamatoria^{180,181}.

II.2.1- COLAGENASA

La colagenasa es una metaloendopeptidasa dimerica de 70 a 76 kD de masa molecular localizada en los gránulos específicos de los polimorfonucleares.

Para que la colagenasa pueda degradar el colágeno nativo, éste primero debe ser liberado de los componentes microfibrilares por acción de otra proteasa neutra, como la elastasa.

En el neutrófilo humano existen dos colagenasas isoméricas. La colagenasa es inhibida por EDTA, cisteína, α_2 -macroglobulina y α_1 -inhibidor de proteínasa¹⁷⁹.

II.2.2- CATEPSINA G

La catepsina G es una serinoendopeptidasa de peso molecular 32 kD producida en la etapa de diferenciación de la serie granulocítica y almacenada en los gránulos azurófilos de los polimorfonucleares. La catepsina G en el PMN tiene acción bactericida; liberada al compartimiento extracelular degrada los proteoglicanos de los cartílagos, colágeno insoluble, fibrinógeno, histonas y hemoglobinas¹⁷⁹. La catepsina G es un potente agonista plaquetario que aumenta el Ca^{2+} citoplasmático en las plaquetas a través de su unión a un receptor específico^{182,183}.

Es inhibida por la α_2 - antitripsina y la α_2 - macroglobulina y en menor grado por el α_1 -inhibidor de proteinasa. Los inhibidores sintéticos de catepsina G son DFP (di-isopropilfluorofosfato), PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro), el inhibidor de tripsina de semilla de soja y aprotinina.

II.2.3- MIELOBLASTINA O PROTEINASA 3 LEUCOCITARIA

La mieloblastina, inicialmente denominada proteinasa 3, es una serina endopeptidasa de masa molecular 29 kD que se produce en la etapa de diferenciación mieoide y se almacena en los gránulos azurófilos del neutrófilo en cantidades similares a la de la elastasa y catepsina G. La composición aminoacídica de la mieloblastina es similar a la de las otras proteasas neutras de los gránulos primarios^{179,184}.

La proteinasa 3 interviene en el control de crecimiento y diferenciación de células leucémicas, causa daño tisular y efisema, tiene actividad bactericida y reacciona contra los anticuerpos antineutrófilos citoplasmáticos (ANCA) presentes en la granulomatosis de Wegener. La mieloblastina degrada in vitro a la elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, colágeno tipo IV e hidroliza hemoglobina.

Hasta el momento no se ha identificado ningún sustrato que sea hidrolizado por la proteinasa 3 y no por la elastasa.

La proteinasa 3 es inhibida fisiológicamente por α_1 -inhibidor de proteinasa y α_2 -macroglobulina. Las antileucoproteasas de las secreciones y fluidos intersticiales son degradadas por la mieloblastina.

La mieloblastina también es inhibida por inhibidor de tripsina de soja y Eglin c, pero no es inhibida por aprotinina (eficiente inhibidor de elastasa y catepsina G).

La mieloblastina es inhibida in vitro por PMSF, DIFF y algunos derivados de las clorometil cetonas inhibidores de la elastasa.

II.2.4 - ELASTASA LEUCOCITARIA

La elastasa de los PMN (E.C. 3.4.21.37) es una endopeptidasa glicosilada de una sola cadena, de peso molecular 30 kD que tiene actividad de serinoproteasa. La elastasa se sintetiza durante la etapa temprana de la diferenciación mieloide y se almacena en los gránulos azurófilos de los granulocitos, los cuales contienen 3-4 mg de elastasa / 10^6 cel. El recambio de la elastasa leucocitaria es de 300 a 400 mg/día, lo cual evidencia la potencia del sistema proteolítico del polimorfonuclear.

En los gránulos azurófilos existen cuatro isoformas de elastasa leucocitaria que tienen secuencias aminoácidas aminoterminales idénticas, sugiriendo que la diferencia de movilidad electroforética se deben a variaciones en el contenido de carbohidratos¹⁸⁵.

La secreción de elastasa comienza a los 5 segundos de haber sido estimulados los PMN y se completa en los 30 segundos posteriores; esta liberación aumenta en respuesta a un estímulo bacteriano. La elastasa en el fagosoma no sería bactericida por sí misma, sino que induciría cambios subletales en algunos microorganismos haciéndolos más susceptibles a agentes microbicidas como la mieloperoxidasa. Si la

elastasa leucocitaria, liberada al medio extracelular durante la fagocitosis o regurgitación, supera la acción de los inhibidores de proteasas, comienza a actuar sobre diversos componentes plasmáticos de la matriz extracelular, degradando e inhibiendo la síntesis de los proteoglicanos y denudando las fibras de colágeno; la elastasa leucocitaria tiene acción proteolítica sobre la elastina, colágeno tipo I, II, III, IV y fibronectina (componentes de la matriz extracelular), factores de coagulación, proteínas del sistema complemento, inmunoglobulinas, antitrombina III, α_2 -antiplasmina, transferrina y prealbúmina. También actúa extracelularmente junto a las metaloproteasa 3 (estromeliasina) y metaloproteasa 2 (gelatinasa), las cuales digieren colágeno tipo I, IV, IX, laminina, fibronectina y gelatina.

La elastasa sería un modulador de la respuesta plaquetaria ya que degrada las glicoproteínas de membrana GPIb y GPIIb/IIIa¹⁸⁵.

Los inhibidores plasmáticos de la elastasa leucocitaria liberada a circulación son α_1 -inhibidor de proteinasa (α_1 -PI) y α_2 -macroglobulina, (α_2 -M). La vida media del complejo (E - α_1 -PI) es de una hora, mientras que la del complejo (E - α_2 -M) es de 10 minutos.

El α_1 -inhibidor de proteinasa (α_1 PI), conocido también como α_1 antitripsina, está presente en altas concentraciones en la sangre, en el fluido intersticial y en las secreciones mucosas. El α_1 PI reacciona con la elastasa como un inhibidor competitivo, formando un complejo equimolecular sin actividad enzimática. El complejo elastasa - α_1 -PI (EAPI) se disocia, con transferencia de la elastasa a la α_2 macroglobulina. Los agentes oxidantes producidos por los neutrófilos producen una desnaturalización oxidativa del α_1 PI con disminución de afinidad por la elastasa leucocitaria^{185,189}.

La α_2 macroglobulina (α_2 M), un inhibidor de proteasas estrictamente plasmático, actúa como un inhibidor secundario de la elastasa. La inhibición de

elastasa por la α_2 M es el resultado de la hidratación estérica del centro activo de la enzima con formación de un complejo estable. El complejo (E - α_2 -M) no tiene actividad sobre sustratos proteicos de alto peso molecular pero presenta actividad estearásica frente a los sustratos sintéticos de bajo peso molecular.

Los inhibidores fisiológicos de elastasa a nivel tisular intersticial son la α_1 -antitripsina, la antileucoproteasa de la secreción salival y antitripsina urinaria.

Los inhibidores sintéticos de elastasa son los derivados de la clorometilcetona (ejemplo, la aprotinina) y trifluorcetil péptidos (ejemplo, el PMSF).

Los derivados de las clorometilcetonas tienen actividad antielastásica in vivo. La heparina y la catepsina G inhiben la actividad de elastasa y la magnitud de la inhibición depende del grado de sulfatación del glicosaminoglicano.^{42,45}

La elastasa leucocitaria presenta isoformas ubicadas específicamente en células mononucleares, plaquetas, aórticas y en el páncreas.

La elastasa plaquetaria: se encuentra en la plaqueta en forma de proenzima (proelastasa plaquetaria) y en forma activa. La proelastasa plaquetaria es tripsina dependiente; la elastasa plaquetaria es aniónica; agentes quelantes de metales como el EDTA inhiben parcialmente su actividad y no presenta inmunoreactividad cruzada ni con la elastasa leucocitaria ni con la pancreática.

La elastasa plaquetaria intervendría en la elastolisis arterial inducida por plaquetas. La elastasa plaquetaria y/o la elastasa leucocitaria inhiben la respuesta plaquetaria a la acción de los agonistas trombina, colágeno y ristocetina¹⁸⁵.

La elastasa de los macrófagos alveolares y peritoneales es una metaloproteasa, que es inhibida por los quelantes de metales pero no es afectada por clorometilcetona ni por el fenil metil sulfonil fluoruro. La elastasa de los macrófagos no es inhibida por α_1 -inhibidor de proteinasa y es capaz de degradarlo por proteólisis sustrato inespecífica. La elastasa de los macrófagos tiene distinta especificidad para las insulinas que la elastasa leucocitaria¹⁸⁵.

La elastasa pancreática es producida por el acino pancreático en forma de proelastasa, sin actividad enzimática. Existen dos isoformas de proelastasa pancreáticas: proelastasa 1 y proelastasa 2. Las proelastasas se liberan junto a las demás proteasas pancreáticas en el intestino delgado donde son inactivadas por la microflora intestinal. La tripsina transforma a la proelastasa 1 y 2 en las correspondientes formas enzimáticamente activas, elastasa 1 y 2.

La elastasa 1 es una proteína aniónica, de peso molecular 30 kD y está presente en plasma en forma del complejo con α_1 -inhibidor de proteinasa. La elastasa 2 es una proteína catiónica de peso molecular 24 kD que se encuentra en plasma unido a α_1 -inhibidor de proteinasa. Ambas elastasas pancreáticas tienen comportamientos enzimáticos distintos y diferente afinidad con los diversos sustratos que degradan. La elastasa 1 y 2 actúan sinérgicamente para degradar elastina ¹⁸⁵.

La elastasa aórtica tiene alrededor de 22 kD de peso molecular y difiere de las otras elastasas de origen humano en su composición aminoacídica y su actividad inmunológica. La elastasa aórtica se encuentra localizada en células endoteliales y en espacios subendoteliales de la aorta y a nivel de la membrana plasmática. Actuaría en la degradación de elastina de la pared arterial durante la maduración y envejecimiento de los tejidos. Los glicosaminoglicanos de la aorta inhiben la actividad elástica de la pared arterial.

Si bien la elastasa aórtica ha sido señalada como anti-aterosclerótica por algunos autores, la mayoría de los investigadores coinciden en que contribuiría al desarrollo de la aterosclerosis.

II.2.4.1- ACCION PROTEOLITICA DE LA ELASTASA LEUCOCITARIA SOBRE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE COAGULACION

La elastasa es liberada por los neutrófilos durante la coagulación “in vitro”, proceso dependiente de la concentración de calicreínas. In vitro la elastasa leucocitaria inactiva rápidamente por proteólisis los factores I, II, VII, VIII, IX y XII purificados, mientras que el V es inactivado luego de ser transitoriamente activado por la elastasa ^{188,189}.

La elastasa cliva tanto la subunidad enzimáticamente activa (subunidad a) como la proteína transportadora (subunidad b) del factor XIII ¹⁹⁰.

La acción de la elastasa sobre el fibrinógeno genera productos de degradación del fibrinógeno estructural e inmunológicamente diferentes a los productos de degradación obtenidos por acción de plasmina. Distintas concentraciones de elastasas generan fragmentos de fibrinógeno diferentes, en cambio cuando la fibrinógenolisis ocurre a través de la plasmina, los productos formados son siempre los mismos, lo cual indica que la acción plasmínica es limitada. Cuando la elastasa cliva al fibrinógeno se altera, entre otros, el péptido 30-43 de la cadena β quien causa la dilatación de las arterias mesentéricas e incrementa los niveles de AMP_c y GMP_c en los vasos. La elastasa modifica, in vitro, la actividad funcional e inmunológica de la ATIII, principal inhibidor fisiológico de trombina ^{191,192}. La elastasa cliva la trombosmodulina unida a la célula endotelial generando un péptido que tiene efecto catalítico sobre la activación de la proteína C por trombina.

Diversos estudios clínicos han demostrado que existe asociación entre los niveles plasmáticos del complejo elastasa - α_1 PI y las alteraciones en el sistema coagulación que presentan pacientes sépticos y leucémicos ^{193,194}. Estos pacientes presentan un estado de hipercoagulabilidad, demostrado por la detección de altos niveles plasmáticos del complejo trombina-antitrombina III.

II.2.4.2- ¿LA ELASTASA LEUCOCITARIA ES UNA ENZIMA ANTI O PROFIBRINOLITICA?

In vitro, los leucocitos se acumulan en el trombo y migran a los sitios donde hay deposición de fibrina; los neutrófilos liberan, su contenido lisosomal casi simultáneamente con el inicio de la coagulación ¹⁸⁷.

Desde hace años se conoce la acción fibrinogenolítica de la elastasa, sin embargo el avance de los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares de fibrinolisis en los que intervienen el t-PA y el Plg, ha permitido demostrar que la lisis de fibrina por elastasa reduce el efecto catalítico de la fibrina sobre la activación del plasminógeno mediado por t-PA.

La acción anti o profibrinolítica de la elastasa es entonces la resultante de acciones diversas; la elastasa cliva al plasminógeno y a la α_2 -antiplasmina; degrada al fibrinógeno transformándolo en incoagulable y degrada la cadena α de la fibrina. Si bien in vitro, altas concentraciones de elastasa (concentraciones no fisiológicas) inactivan, a la α_2 -antiplasmina ¹⁹⁵, in vivo no se han reportado disminución de los niveles de actividad plasmática en pacientes con altos niveles de complejo elastasa - α_1 -inhibidor de proteinasa ^{17,196}; es probable que la acción sobre la α_2 -antiplasmina ocurra en el microambiente cercano a la degranulación de los leucocitos.

Se ha demostrado que la degradación de la cadena α de la fibrina reduce el efecto estimulante de la fibrina sobre la activación del plasminógeno mediado por t-PA, por lo que una acción aparente profibrinolítica, se transforma in vitro, en antifibrinolítica. Cuando se deja coagular sangre entera, obtenida por post oclusión venosa, que contiene altos niveles de t-PA; en presencia de elastasa, se produce un retraso en el tiempo de lisis del coágulo¹⁹⁷. Los polimorfonucleares neutrófilos tendrían un sistema de proteasas de membrana que potenciarían la acción de la plasmina sobre el coágulo de fibrina ¹⁹⁸.

Todos estos hallazgos sugieren que en los procesos inflamatorios, in vivo, cuando la elastasa liberada al compartimiento extracelular y sobrepasa la acción de sus inhibidores, inhibiría la lisis del coágulo.

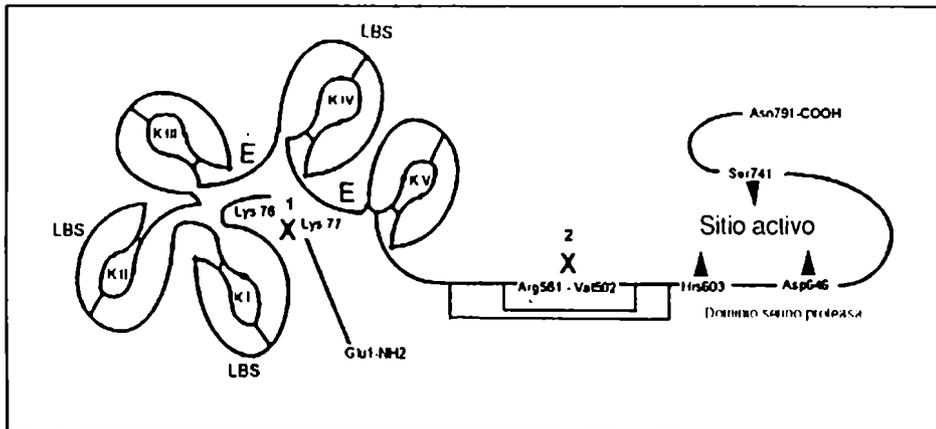
Este hecho, junto a los niveles descendidos de plasminógeno, el aumento de PAI-1 y el estado hipercoagulable presente en los pacientes sépticos, explicaría la formación de depósitos de fibrina señalados como una de las causas de la falla orgánica múltiple en los pacientes sépticos.

II.2.4.3- ACCION DE LA ELASTASA LEUCOCITARIA SOBRE EL PLASMINOGENO: MINIPLASMINOGENO

La elastasa leucocitaria degrada, por proteólisis limitada, al plasminógeno en varios fragmentos que contienen distintos kringles (K): K1234, K123, K4 y K5. El mecanismo postulado de la digestión de Plg por elastasa es el siguiente:

En primer lugar son clivados los enlaces Val₃₃₇-Ser₃₃₈ y Val₃₅₃-Val₃₅₄. Esto conduce a la producción de dos péptidos aminoterminales, correspondientes a los residuos Tyr₇₉-Val₃₃₇ y Tyr₇₉-Val₃₅₃ y dos formas de Plg intermedia, correspondiente a la región aminoterminal Ser₃₃₈-Asn₇₉₀ y Val₃₅₄-Asn₇₉₀. Posteriormente, por acción de la elastasa, se liberan los péptidos Ser₃₃₈-Val₃₅₃ y Val₃₅₄-Ala₄₃₉, formándose el miniplasminógeno Val₄₄₂-Asn₇₉₀. Los fragmentos correspondientes a los residuos aminoacídicos 1-78 y 440-441 son degradados totalmente ^{18,199}.

El fragmento que contiene el K123 del plasminógeno, denominado angiostatina, ha demostrado ejercer una actividad inhibitoria de la proliferación de las células del endotelio capilar, in vitro ²⁰⁰. El fragmento que corresponde al kringle4 aislado estimula la proliferación de las células endoteliales in vitro; esta estimulación es inducida por el factor básico de crecimiento del fibroblasto.



El fragmento que contiene el sitio activo y al kringle5 denominado Val₄₄₂ plasminógeno o miniplasminógeno (miniPIg), presenta una masa molecular de 38 kD.

El miniplasminógeno ha sido detectado en pacientes sépticos ¹⁷ originado probablemente por acción de las enzimas leucocitarias liberadas en el proceso inflamatorio generalizado que presentan estos pacientes.

El miniPIg no se une a una columna de lisina sefarosa ya que no tiene sitios de unión a lisina pero se une a la fibrina a través de un sitio aminoaxil (AH) presente en el K5 ¹⁹⁹. El miniplasminógeno es activado por estreptoquinasa y uroquinasa a miniplasmina ^{199,201}. La activación de miniPIg por SK y UK muestra una cinética similar a la obtenidos cuando se activa plasminógeno ^{200,12}. El t-PA de útero humano purificado y recombinante activan miniplasminógeno a miniplasmina, reacción potenciada por fibrina y por fibrinógeno pero no por los fragmentos D y E que en cambio sí potencian la activación del plasminógeno in vitro ¹²²⁰². La utilización de anticuerpos monoclonales permitió establecer que la activación de miniPIg por uroquinasa, t-PA y eestreptoquinasa involucra en la catálisis regiones de la molécula de miniPIg distintas de las que intervienen en la activación del PIg.

La miniplasmina muestra actividades similares a la plasmina para hidrolizar sustratos sintéticos de plasmina a pH 7,8 y 25°C^{199,202}. La miniplasmina, al igual que la plasmina, cataliza la hidrólisis de los enlaces del sustrato.

La miniplasmina presenta mayor o menor actividad que la plasmina frente al coágulo de fibrina en forma concentración dependiente.

El ácido 6 aminohexanoico (EACA) es, in vitro, inhibidor competitivo de la miniplasmina. Los datos cinéticos obtenidos para esta reacción de inhibición son los mismos que los encontrados para la plasmina. La miniplasmina es inhibida por α_2 -antiplasmina y la α_2 -macroglobulina, mediante la formación de un complejo equimolecular. La velocidad de inactivación de plasmina por α_2 -antiplasmina es mayor que la de miniplasmina. La fibrina disminuye la velocidad de inactivación de ambas enzimas fibrinolíticas. La miniplasmina también es inhibida in vitro por la antitrombina III pero este hecho no sería importante a nivel fisiológico. La heparina no modifica la actividad fibrinolítica de la plasmina ni de la miniplasmina⁴²²⁰⁴.

II.3- LEUCOCITOS E INFLAMACION

Diversos estudios han demostrado que en los sitios de injuria tisular ocasionada ya sea por infección bacteriana, deposición de complejos antígeno-anticuerpo, daño celular físico (calor o frío, productos químicos) o cualquier otra causa, ocurren un conjunto de reacciones interrelacionadas, denominadas “proceso inflamatorio”¹⁸¹.

Estas reacciones son similares pero no idénticas en todas las situaciones de daño tisular y varían en intensidad y duración de acuerdo a la magnitud de la injuria inicial.

En las injurias leves, se produce una vasodilatación de las vénulas postcapilares acompañado de un incremento de la permeabilidad vascular; luego de aproximadamente 10 minutos se libera localmente histamina, citoquinas y enzimas

lisosomales de los neutrófilos presentes en el tejido dañado. Como resultado de la acción de los distintos mediadores celulares entre las dos y diez horas posteriores al incidente, vuelve a incrementarse la permeabilidad vascular con mayor adherencia de leucocitos al endotelio dañado.

Fisiológicamente las células endoteliales son impermeables a la transferencia pasiva de células sanguíneas, pero en los sitios dañados los leucocitos se unen a través de sus receptores con receptores constitutivos e inducibles presentes en la membrana de la célula endotelial. Los leucocitos adheridos a la célula endotelial migran luego, entre las células endoteliales hacia los espacios extravasculares ²⁰⁵.

La extravasación de los leucocitos desde la luz del vaso hacia el sitio inflamado requiere una unión específica seguida por la migración de los neutrófilos a través del endotelio hacia el foco inflamatorio y la activación de la célula endotelial ²⁰⁶.

La interacción de los leucocitos con el endotelio ocurre a través de moléculas de adhesión específicas.

Continuamente se están describiendo nuevas moléculas que participan en las diversas interacciones célula-célula que ocurren en el proceso inflamatorio, pero algunas ya han sido caracterizadas y clonadas. La molécula de adhesión entre endotelio y leucocito, ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) es una proteína de 115 kD, inducible sobre la membrana de la célula endotelial por distintas citoquinas (IL-1, IL-8, TNF, PAF) que media la unión de los polimorfonucleares al endotelio.

La molécula de adhesión intercelular, ICAM-1(CD54) (intercellular adhesion molecule -1), aumenta su concentración sobre la membrana de la célula endotelial por acción de interferón δ , IL-1 y TNF y media la adhesión del neutrófilo a través del receptor LFA-1 (CD11a/CD18) presente en su membrana de este último.

La molécula de adhesión intercelular, ICAM-2, es una molécula homóloga de ICAM-1, que también media las adhesiones celulares a través de LFA-1.

Cuando la injuria es pequeña, la concentración sanguínea de leucocitos no cambia. Si la lesión es extensa son necesarios una gran cantidad de leucocitos, los cuales

migran desde los sitios de producción o almacenamiento hacia el tejido dañado produciendo una leucocitosis o leucopenia transitoria de acuerdo a la patología.

Además de los neutrófilos, los macrófagos también migran hacia el sitio injuriado, donde ingieren restos de tejidos, eritrocitos y neutrófilos; también se multiplican.

La molécula de adhesión de células vasculares VCAM-1, es inducida por citoquinas, y une linfocitos y monocitos a través de las integrinas VLA-4 de sus membranas.

La participación de los eosinófilos y los basófilos es escasa en la mayoría de los procesos inflamatorios, aunque son capaces de adherirse a las células endoteliales in vitro.

La IL-8 ha sido señalada como moduladora de la migración de los leucocitos en el sitio de la inflamación. Sin embargo hay que tener en cuenta, que en el sitio de injuria coexisten varias citoquinas y que además se activan simultáneamente los sistemas de complementos, coagulación, fibrinolítico y calicreínas-quininas, por lo tanto es difícil que experimentos in vitro aislados reflejen las distintas interacciones que ocurren en el proceso inflamatorio.

La inflamación, aparece entonces, como un proceso útil para la defensa del organismo. Pero existen situaciones en que se produce la liberación de las enzimas hidrolíticas en el tejido (por ejemplo cuando el neutrófilo ingiere cristales de ácido úrico) produciendo distinto grado de daño tisular en el propio organismo del huésped, como ocurre en sepsis y otras patologías ¹¹⁸.

III.- HEMOSTASIA Y SEPSIS

III.1- SEPSIS: DEFINICIONES.

Durante varios años los términos sepsis, shock séptico, infección, septicemia y síndrome séptico han sido utilizados por los investigadores con distintas acepciones. Debido a la falta de una clara e inequívoca definición de las poblaciones de pacientes, la interpretación de los resultados se tornó complicada y poco útil.

En 1992 los miembros de American College of Chest Physicians y de Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM Consensus Conference) ²¹¹ se reunieron en una Conferencia para consensuar la utilización de una terminología con el fin de eliminar confusiones y poder comparar protocolos, A partir de ese momento los términos sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), infección y falla orgánica múltiple son aceptados universalmente como se definen a continuación. (Fig.III.1).

El término sepsis significa una respuesta inflamatoria sistémica a la infección.

La frase síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) describe un proceso inflamatorio independiente de las causas que lo originan. El estado definido como SIRS presenta al menos dos de las siguientes manifestaciones clínicas:

a) Temperatura mayor a 38°C o menor a 36°C ; b) frecuencia cardíaca mayor a 90 pulsaciones/min.; c) frecuencia respiratoria menor a 20 beats/min o la pCO₂ menor a 32 mm de Hg y d) un recuento leucocitario mayor a 12.000 cel/mm³ o menor a 4000 cel/mm³ o más del 10% de formas inmaduras.

La inflamación sistémica puede ser la respuesta a una gran variedad de estímulos: trauma múltiple, injuria tisular, shock hemorrágico, administración exógena de mediadores del proceso inflamatorio, pancreatitis, infección, quemaduras y otros.

Cuando la inflamación sistémica es el resultado de un proceso infeccioso establecido, se denomina sepsis y por lo tanto el paciente séptico debe manifestar

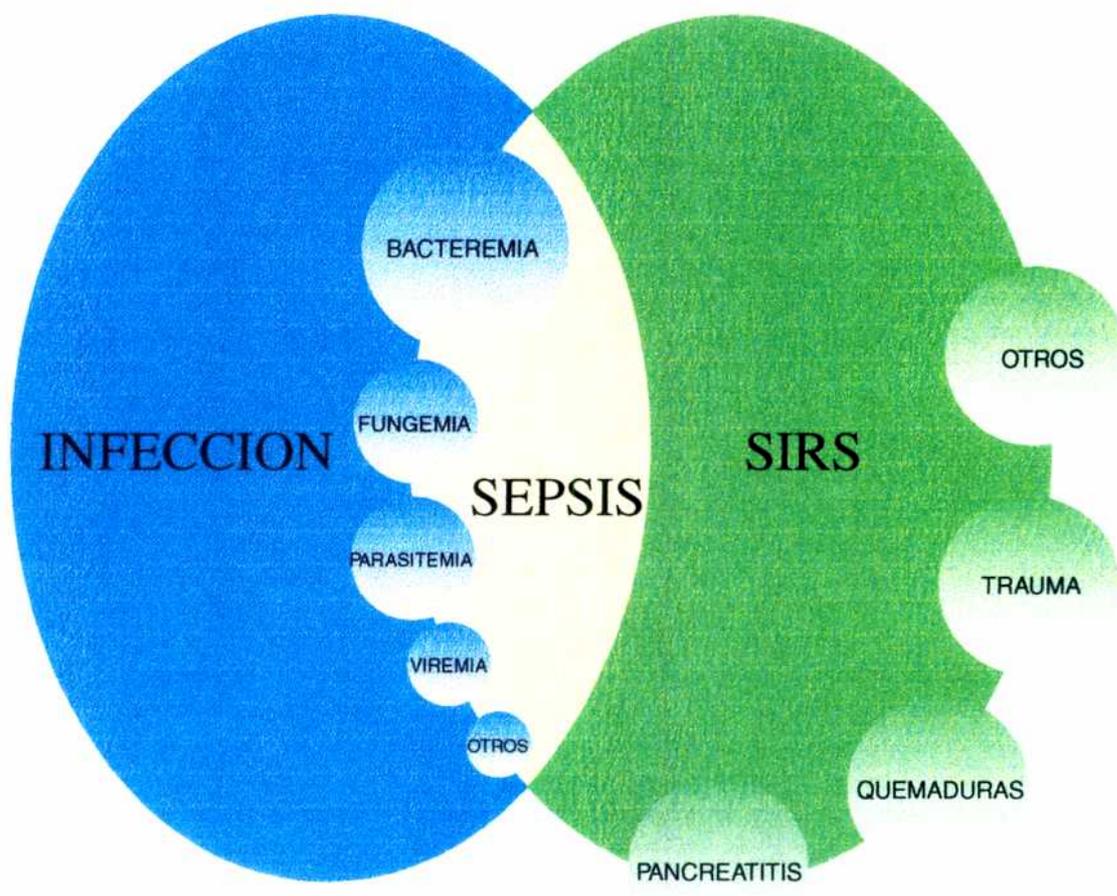


Fig. III . 1 - Interrelación entre el Síndrome de Respuesta Sistémica Inflamatoria (SIRS), Sepsis e Infección.

clínicamente al menos dos de las alteraciones enumeradas anteriormente. Es decir que, cuando el proceso inflamatorio es debido a una infección, los términos sepsis y SIRS son sinónimos. La sepsis es clínicamente indistinguible del SIRS.

La infección es el fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia o invasión de tejidos tisulares estériles del huésped, por microorganismos.

La bacteremia es la presencia de una bacteria viable en la sangre. Así, la presencia de virus, hongos, parásitos, son descritas como viremia, fungemia, parasitemia, respectivamente.

La evolución de la sepsis representa un conjunto de estados continuos de severidad variable.

El término sepsis severa está asociado a una disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, con o sin acidosis láctica, oliguria y alteración del estatus mental.

El shock séptico está definido por una hipotensión persistente, inducida por sepsis, con la presencia de anormalidades de hipoperfusión o disfunción orgánica.

Los términos septicemia y síndrome séptico utilizados previamente fueron descartados por la Conferencia Consenso.

El síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS: multiple organ dysfunction syndrome) es la presencia de alteraciones de la función orgánica en un enfermo crítico que impide el mantenimiento de la homeostasis sin intervención externa. La acepción MODS describe un conjunto de síntomas y signos múltiples y progresivos que están relacionados patofisiológicamente. El MODS es un proceso dinámico, modulado por numerosos factores externos y del huésped en períodos de tiempo variable.

El MODS puede ser primario o secundario. El MODS primario es el resultado directo de la acción de un agente agresor bien establecido en el cual la falla orgánica ocurre tempranamente y puede ser atribuida directamente a la agresión misma (El MODS es consecuencia directa del insulto).

El MODS secundario se desarrolla no como una respuesta directa a la agresión, sino como consecuencia de una respuesta exacerbada del huésped y es identificado en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, (sepsis en el caso de infección). Dado que SIRS (sepsis) es un proceso continuo, el MODS debe entenderse como el evento de mayor severidad que caracteriza al SIRS (sepsis). El MODS aparece un tiempo después (período de latencia) de ocurrida la agresión.

III.1.1- FISIOPATOLOGIA DE LA SEPSIS

La sepsis es una causa común de morbilidad y mortalidad, particularmente en pacientes añosos, inmunocomprometidos y severamente enfermos.

Los síntomas clínicos de la sepsis son múltiples: fiebre, leucocitosis, trombocitopenia, taquicardia, coagulación intravascular diseminada difusa, etc.

Desde el punto de vista molecular se pueden establecer tres fases en la respuesta inflamatoria a una infección: a) iniciación de la cascada séptica por liberación de una endotoxina proveniente de bacterias Gram negativas, antígenos virales o fúngicos, productos de la pared celular de las levaduras y bacterias Gram positivas; b) síntesis y secreción de diversas citoquinas por el macrófago; c) activación de la cascada inflamatoria que culmina con lesión endotelial ²¹⁹.

Es muy difícil establecer exactamente la secuencia de activación que conduce a la sepsis ya que las interacciones célula-célula, mediador-célula y citoquina-citoquina son extremadamente complejas. A partir de numerosos estudios realizados in vitro y de la administración de distintos mediadores a personas sanas, Bone ha postulado el mecanismo bioquímico detallado a continuación para una sepsis iniciada por endotoxina ²¹³. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) constitutivos de la pared celular de las bacterias Gram negativas que consiste en tres partes: una parte lipídica (Lípido A) y dos estructuras de carbohidratos.

Una vez liberada la endotoxina , en el sitio de la injuria, promueve la liberación de factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 y el factor activante de plaqueta (PAF) de los macrófagos y otras células.

La IL-1, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-6 son las citoquinas señaladas como principales mediadores de la sepsis. También activan el sistema de coagulación, el sistema de complemento y el sistema fibrinolítico, aunque no está establecido si la activación es producto directo de la endotoxina, estimulación de TNF u otro mediador. Diversos estudios han demostrado que la activación del sistema de coagulación se daría, por la vía del factor tisular (factor VIIa) por acción de la IL-6. La activación del sistema fibrinolítico en cambio estaría mediada por el TNF.

Recientemente se ha descrito que la IL-10 suprimía la activación del sistema fibrinolítico por supresión de la síntesis de TNF ²¹⁴.

El ácido araquidónico es metabolizado a leucotrienos en presencia de IL-1 y TNF.

La IL-1 y la IL-6 activan a los linfocitos T para producir interferón, IL-2, IL-4 y el factor estimulante de la colonia granulocítica-macrófago. La endotoxina activa el sistema complemento (particularmente fragmento C3d y C5a) y dicho proceso, junto a los otros mediadores, potencian la adhesión de leucocitos al endotelio la activación de neutrófilos y la agregación plaquetaria. Los neutrófilos activados también contribuirían al daño endotelial por liberación de las enzimas lisosomales y por su propia adhesión y agregación. Las moléculas de adhesión, ligandos para los receptores de las células inflamatorias, que intervienen en el proceso séptico son: ELAM-1 (une neutrófilos al endotelio vascular), ICAM-1 (une neutrófilos y linfocitos β (pero no T) al endotelio y participa en la transmigración del neutrófilo a través de las monocapas del endotelio) y VCAM-1 las moléculas de adhesión de células vasculares (participan en la unión de monocitos y linfocitos al endotelio vascular).

La endotoxina, el $\text{TNF}\alpha$, PAF, los leucotrienos y el tromboxano A_2 incrementan la permeabilidad endotelial. El endotelio a su vez, libera el óxido nítrico y la endotelina-1.

Las citoquinas liberadas por el macrófago en el sitio de la injuria, pueden individual o conjuntamente, causar daño endotelial o activar otras células y sistemas celulares en el microambiente cercano al sitio de la injuria. Cuando el sistema de defensa del organismo se descontrola, uno o más mediadores o la endotoxina misma, puede ser liberada a la circulación y dar origen a una respuesta generalizada.

La acción de endotoxinas y citoquinas en circulación inducen en el endotelio, cambios estructurales, metabólicos y de expresión genética que incrementan la permeabilidad; además producen activación de la célula endotelial con mayor exposición de receptores para leucocitos y disminuyen sus propiedades antitrombóticas.

La activación endotelial producida y los distintos mediadores, originan un desequilibrio en el balance hemostático con predominio de mecanismos proagregantes, procoagulantes y antifibrinolíticos que podrían contribuir al desarrollo de una microtrombosis a nivel capilar, episodio señalado como una de las causas principales de la falla orgánica múltiple.

El desarrollo de la sepsis sería entonces el resultado de una respuesta excesiva y descontrolada del mecanismo de defensa fisiológico en el hombre, como lo son la liberación de las citoquinas y la activación de los sistemas celulares, el sistema de coagulación, los sistemas fibrinolíticos y el sistema complemento^{181,213}.

No todo individuo que tenga una infección va a dar origen a una sepsis. El hecho que la sepsis se desarrolle o no, dependerá de varios factores: la presencia de mediadores celulares ya existentes en circulación, la presencia de macrófagos, la activación de los neutrófilos en circulación, el estado general del paciente, el estado del endotelio del paciente y la acción de diversos moduladores de la inflamación sintetizados algunos de ellos, por la propia célula endotelial (productos oxidativos, prostoglandinas E2).

III.2- EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA EN SEPSIS

Las alteraciones hemostáticas en pacientes con sepsis, septicemia, shock séptico, y falla orgánica múltiple se conocen desde hace varios años ^{193,215,217}. La activación de la cascada de proteasas plasmáticas y celulares (enzimas leucocitarias) sería la causa del daño celular presente en el evento séptico ²¹¹⁻²¹³.

Los estudios en pacientes sépticos pueden ser útiles para el diagnóstico, ya que una continua activación podría indicar la persistencia del foco séptico; como pronóstico, ya que el grado de desvío del perfil normal podría estar asociado al riesgo de muerte del paciente y para la terapéutica, porque se dispone de diversos medicamentos para modular la activación de los distintos sistemas de proteasas plasmáticas.

Si bien se han realizado numerosos estudios para establecer los diversos mecanismos implicados en la sepsis, recién a partir del año 1992 (año de la Conferencia Consenso) estos resultados son comparables ²¹¹.

Un ejemplo de ello son los estudios señalados a continuación:

Estudio: Hesselvik 1989: Prospectivo seriado durante 3 días²¹⁸

Población: n=53 con sepsis severa 60(28-81) años.30/53 sobrevivieron
12/53 con shock séptico y 12/53 sobrevivieron
11/53 con shock séptico, falla orgánica múltiple y no sobrevivieron
Compara acción contra controles normales

Terapia:Heparinización con heparina fraccionada en bajas dosis.Administración de plasma

Sistema de coagulación: Fib ↑↑, FVIII ↑↑, FVII ↓↓, FXII ↓, FvWag ↑,
FV=N
ATIII↓ y PC ↓
PK↓ en pacientes con shock

Sistema fibrinolítico: Plg N en pac. s/shock
Plg↓ al día 1 y luego normaliza en los 12 pacientes con shock séptico que sobrevivieron..
Plg↓ en pac c/shock y no sobrevivientes
APL↓ en los no sobrevivientes
PAI-1↑↑ en no sobrevivientes

Mediadores celulares: No determina

Conclusiones: PAI-1↑↑ en sépticos c/shock que murieron: hipofibrinólisis
Activación del sistema de coagulación
Sépticos tienen marcada activación del sist. coagulación e hipofibrinólisis
Marcador propuesto: PAI-1 y ATIII

¹ **Estudio: Philippé J. 1991:** Estudiados al ingreso ²²⁰.

Población: n=30 infección severa sin sepsis 64 (26-82) años
n=24 sepsis y shock séptico
9/24 sobreviven 60 (26-89) años
15/24 murieron 60 (22-72) años
24 con hemocultivos positivos
Compara contra normales

Terapia: Profilaxis con heparina de bajo peso molecular

Sistema de coagulación: ATII Límite inf. normal PC ↓ en infección severa
ATIII↓, PC↓↓, PC está signif. ↓ en pac.no sobrevivientes con sepsis.

Sistema fibrinolítico: Plg no determina
PAI ↑ t-PAact N y t-PAag ↑ u-PA N, en infec. severa
PAI ↑↑↑ t-PAact ↑ t-PAag ↑ u-PA ↑↑↑, en sepsis y shock

Mediadores celulares: no determina

Conclusiones: Sepsis y el shock están asociados con elevación de u-PAag.
La PC, ATIII, estan significativamente disminuída en los pacientes sépticos con respecto a la infección sin sepsis.
El t-PA act y PAI-1ag estan significativamente aumentados en los pacientes con sepsis

¹ NOTA: Si bien los trabajos deHesselvik (1989) y el de Philippe (1991) son anteriores a la Conferencia Consenso de 1992, fueron incluidos en esta reseña porque el criterio de sepsis utilizado en la seleccion de pacientes concuerda con lo establecido en 1992.

Estudio: Dodderhoff 1992: Prospectivo al ingreso ²¹⁹.

Población: n=20 , 67 años
APACHEII 20 (7 a 33)
8/20 con shock séptico
10/20 hemocultivos positivos
Compara contra pacientes internados en la misma unidad de terapia (n=7)

Terapia: No informa

Sistema de coagulación: no determina

Sistema fibrinolítico: Plg no determina, PAI-1 ag ↑

Mediadores celulares: TNF ↑ 18
IL-6 ↑

Conclusiones: El APACHE II correlaciona con el PAI-1 ($r=0.22$) y la IL-6 ($r=0.3$)
La PC, ATIII, están significativamente disminuída en los pacientes sépticos con respecto a la infección sin sepsis.
El t-PA act y PAI-1ag están significativamente aumentados en los pacientes con sepsis

Estudio: Philippé 1992: estudiados al ingreso ²²¹

Población: 35 pacientes con evidencia clínica de infección
3 días de internación en UTI y APACHE >12.
21/35 sobrevivieron (S) APACHE 18 (13-26); 4/21 sepsis
14/35 no sobrevivieron (NS)
12/14 sepsis
9/14 shock séptico
Grupo Control Normal

Terapia: No informa

Sistema de coagulación: no determina

Sistema fibrinolítico: Plg no determina, u-PAag ↑↑ en sobrevivientes
scu-PAag elevado en no sobrevivientes

Mediadores celulares: TNF fue 4 veces más en S que en NS y
correlacionó con el APACHE II

Conclusión: Por regresión logística, encuentran que los niveles de u-PA
son un marcador de sobrevida en infección severa ($p < 0,03$)

Estudio: Lorente1993: prospectivo seriado (días 1,4 y7)²²²

Población: 48 con shock séptico/ edad 57 ± 7.3 años
23/48 sobrevivieron (S), 20 ± 2.9 años
25/48 no sobrevivieron (NS), 22 ± 3.1
APACHE 23 ± 2.3
21/48 hemocultivos positivos
Grupo control Normal

Terapia: Profiláxis con heparina de bajo peso molecular en minidosis

Sistema de coagulación: Fib $\uparrow\uparrow$ significativo en NS todos los días
vWF \uparrow respecto al grupo Normal todos los días
ATIII en límite inferior en NS. sobre recuento día
1,4 y7
PC \downarrow en no sobrevivientes
TAT $\uparrow\uparrow$ en S y NS

Sistema fibrinolítico: Plg al día 1 y Normal en sobrevivientes
Plg \downarrow en no sobrevivientes todos los días
 α_2 antiplasmina Normal
Plg/ α_2 -APL $\cong 0.65$ en no sobrevivientes
PAI-1 $\uparrow\uparrow\uparrow$ en S y NS
t-PAag N
u-PAag g $\uparrow\uparrow$ en no sobrevivientes

Mediadores celulares: no determina

Conclusiones: Los no sobrevivientes tienen una marcada activación del sistema de coagulación y una marcada hipofibrinólisis. Al día 1 no hay diferencia entre sobrevivientes y no sobrevivientes; al estudiarlos en forma seriada comienzan a observarse diferencias significativas entre los niveles de Plg PAI-1 y u-PA entre sobrevivientes y no sobrevivientes.

Estudio: Massignon 1994: al ingreso ²²³

Población: 34 pacientes

10 con cirugía mayor sin enfermedad infecciosa, 64 ± 9 años

12 sepsis sin complicaciones, 54 ± 19 años

12 con shock séptico, 62 ± 13 años

Terapia: No informa

Sistema de coagulación: FVIII $\uparrow\uparrow$ en sepsis y shock séptico

FIX, FXII, FVII: Normal

APTT: Normal

II, V N VII, X: Normal

Fibrinog. lig \uparrow en los tres grupos

vWF \uparrow en tres grupos

ATIII $\downarrow\downarrow$ en shock séptico

ATIII \downarrow en sepsis y cirugía mayor

PC $\downarrow\downarrow$ en shock séptico

PC \downarrow en sepsis y cirugía mayor

Sistema fibrinolítico: Plg no determina

t-PAact Normal

t-PAag \uparrow en shock séptico

PAI-1ag $\uparrow\uparrow\uparrow$ en shock séptico

PAI-1 $\uparrow\uparrow$ en los otros 2 grupos

Plg en shock séptico en límite inferior normal

APL: normal

pdf $\uparrow\uparrow$ en shock séptico y pdf \uparrow en sepsis

Mediadores celulares: IL-1 y IL-6 $\uparrow\uparrow$ en shock séptico

Conclusión: Hay gran activación sist. coagulación en shock séptico asociado con hipofibrinólisis. Propone el índice ATIII/PAI-1 como marcador pronóstico. Hay correlación positiva entre los niveles de TNF e IL-6 y entre PAI-1ag y pdf.

Estudio: Mesters RM 1996: Prospectivo seriado²²⁴

Población: 62 pacientes con cáncer hematológico y con leucopenia inducida por quimioterapia
13/62 sepsis severa
36/62 episodios febriles sin complicaciones

Terapia: Citoestáticos y antimicrobianos

Sistema de coagulación: No determina

Sistema fibrinolítico: Plg no determina
t-PAag ↑ y PAI-1ag significativamente en shock séptico
PAI-1 ↑↑↑↑
APL ↓ en shock

Mediadores celulares: no determina

Conclusiones: La activación del sistema de coagulación y la inhibición del fibrinolítico es casi simultánea en los pacientes leucopénicos
PAI-1act es el mejor marcador pronóstico del evento final.
A mayor actividad de PAI-1 menor probabilidad de supervivencia.

Los resultados de los trabajos expuestos muestran que los cambios detectados en el laboratorio de hemostasia son complejos, variables en el tiempo (de ahí la necesidad de mediciones seriadas) y por lo general difíciles de interpretar. Los diferentes hallazgos ilustran que básicamente en sepsis puede encontrarse cualquier tipo de disturbio hemostático. Si bien es muy difícil comparar los distintos resultados debido a la heterogeneidad poblacional y el tratamiento terapéutico que recibe cada grupo de pacientes, los distintos estudios muestran un sistema de coagulación activado (niveles disminuidos de ATIII y PC, valores aumentados de FVIII y fibrinógeno y del complejo trombina-antitrombina) y un sistema fibrinolítico

deprimido, ya sea por niveles altos de PAI-1 como por niveles disminuídos de plasminógeno. (solo 2 estudios determinan los niveles de este zimógeno)

También en pacientes con shock séptico se han encontrado niveles elevados de TNF, IL-1 e IL-6 existiendo una marcada correlación entre los niveles plasmáticos TNF/IL-6 y los niveles de PAI-1. Este último está presente en la membrana de leucocitos de pacientes sépticos, aunque también podría ser de origen endotelial o provenir de los hepatocitos ²²⁵. Pacientes sépticos y con shock séptico presentaron altos niveles plasmáticos del complejo elastasa - α_1 inhibidor de proteinasa, indicando que existe activación de los granulocitos neutrófilos en este cuadro inflamatorio, aunque la concentración del complejo elastasa - α_1 -inhibidor de proteinasa no correlaciona con la gravedad del paciente.

Si bien, se han propuesto diversos marcadores pronósticos para predecir la probabilidad de sobrevida del paciente de la sepsis, hasta el momento ningún marcador se ha establecido fehacientemente.

Objetivos

I- OBJETIVOS

Trabajos previos de la Dra. Kordich, en pacientes sépticos, mostraron un descenso de los niveles plasmáticos de plasminógeno (Plg) y presentaron actividad plasmínica en la fracción plasmática incapaz de unirse a lisina. Los estudios in vitro de Moroz y de otros autores demostraron que la elastasa leucocitaria cliva al plasminógeno, originando varios fragmentos, uno de los cuales se denomina miniplasminógeno (miniPlg). El miniPlg no se une a lisina y es activable a miniplasmina por uroquinasa y estreptoquinasa.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- a) Investigar prospectivamente en forma seriada en 45 pacientes sépticos consecutivos, los componentes del sistema de coagulación y fibrinolítico (en especial los niveles de plasminógeno).
- b) Investigar si la probabilidad de sobrevida era función de algún parámetro hemostático.
- c) En el caso en que los niveles plasmáticos de Plg estuviesen disminuídos, investigar si la acción de las proteasas leucocitarias era causa del descenso de la actividad de Plg.
- d) Estudiar in vitro la acción de las enzimas leucocitarias y de los polimorfonucleares degranulados sobre el Plg e investigar la presencia de miniPlg en el plasma de los pacientes sépticos.
- e) Estudiar in vitro si el miniplasminógeno presentaba actividad fibrinolítica.

II- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * Determinar en forma seriada en pacientes sépticos los niveles plasmáticos de actividad y de antigenicidad de los componentes (factores e inhibidores) del sistema de coagulación.

- * Determinar los niveles plasmáticos de actividad y de antigenicidad de los componentes del sistema fibrinolítico

- * Determinar los niveles plasmáticos del complejo elastasa - α_1 -inhibidor de proteinasa, como indicador de activación neutrófila

- * Determinar en el plasma de pacientes sépticos la presencia de miniplasminógeno, un fragmento del Plg.

- * Purificar y caracterizar fisicoquímicamente el Plg obtenido a partir de plasma humano.

- * Estudiar in vitro la proteólisis del Plg por acción de elastasa, de extracto leucocitario y de polimorfonucleares activados.

- * Caracterizar fisicoquímicamente el miniPlg obtenido in vitro.

- * Estudiar la cinética de activación del miniPlg con distintos activadores del sistema fibrinolítico (activador tisular del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa).

Materiales
 y
 Métodos

I-EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA EN SEPSIS

I.1. POBLACION

Se estudiaron tres grupos de individuos: pacientes sépticos, pacientes no sépticos de la misma unidad de terapia intensiva y voluntarios sanos (grupo control).

Grupo Séptico (GS): constituido por 45 pacientes que ingresaron en la unidad de terapia intensiva con el diagnóstico de sepsis, de acuerdo al Conferenciae Comitee of The American Collage of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine ²¹¹.

Se diagnosticó sepsis cuando el paciente presentaba evidencia clínica de infección y cumplía dos de los siguientes requisitos: recuento leucocitario <3500 ó $>15.000\text{cel}/\mu\text{l}$ o más de 10% de formas inmaduras, recuento plaquetario $<100.000\text{cel}/\mu\text{l}$; temperatura $<35.5^{\circ}\text{C}$ ó $>38^{\circ}\text{C}$; frecuencia cardíaca mayor que 90 pulsaciones/min; frecuencia respiratoria mayor que 20 inhalaciones/min o la pCO_2 $<32\text{ mm de Hg}$.

La edad fue 58 (38-72) años (mediana y rango), 25 hombres y 33 mujeres.

Todos los pacientes recibieron heparina no fraccionada en dosis profiláctica, no se les suministró vitamina K en la dieta y se les aplicó el tratamiento habitual en estos pacientes.

Grupo No Séptico o Grupo Control Terapia (GCT): formado por 17 pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva (UTI), con problemas traumatológicos o accidente cerebrovascular. Este grupo constituyó un grupo control que reflejaba el manipuleo de la terapia intensiva independiente de la sepsis. La edad fue 52 (30-68) años (mediana y rango); 10 hombres y 7 mujeres.

En los dos grupos de pacientes se estableció la severidad de la enfermedad al ingreso de acuerdo al índice APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Education).

El APACHE II es un puntaje basado en 12 valores fisiológicos de rutina y la edad, que da una medida general de la severidad de la enfermedad. Este índice, que va desde 0 a 71, está asociado con el riesgo de muerte hospitalaria ²²⁶.

Ninguno de los pacientes sépticos o no sépticos internados en la unidad de terapia intensiva mostraron evidencia clínica de coagulación intravascular diseminada.

Grupo Control Normal (GC): constituido por 30 individuos seleccionados de acuerdo a las normas del Panel de Expertos en Teoría de los Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica. La edad, mediana y rango, fue 48 (28-58) años, 21 hombres y 27 mujeres ²²⁷.

Recolección de la sangre:

La sangre se extrajo por punción venosa entre las 8 hs. y las 10 hs. de la mañana y fue colocada en un tubo con citrato de sodio 0.133M (9 partes de sangre + 1 parte de citrato) y 10 UI/ml de aprotinina (Trasylol, Bayer). La sangre se centrifugó 15 min a 2000g y el plasma fue alicuotado y congelado a -70°C. Las determinaciones se realizaron los días 1, 3 y 7 a partir del momento del diagnóstico de sepsis, en el caso de los pacientes sépticos y a los días 1,3 y 7 de haber ingresado a la terapia intensiva en los casos de pacientes no sépticos.

I.2- ESTUDIO DE LOS COMPONENTES PLASMATICOS DEL SISTEMA DE COAGULACION

I.2.1- PRUEBAS GLOBALES

Tiempo de protrombina o tiempo de Quick (T.P): La técnica consiste en determinar el tiempo de coagulación del plasma en presencia de un exceso de factor tisular (Tromboplastina) e iones Ca^{2+} . El tiempo de Quick detecta anomalías en los factores II, V, VII y X. La tromboplastina utilizada es no comercial y fue preparada en el laboratorio según el método de Quick. La determinación se realiza de acuerdo a la técnica original de Quick (1957)²²⁸.

Se realiza una curva de calibración Tiempo de coagulación vs. Protrombina con un pool de al menos 10 plasmas normales y con el tiempo de coagulación de la muestra se extrapola al % de protrombina correspondiente. Los resultados se expresan en % de protrombina.

Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado con Caolin (KPTT):

Esta prueba mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de cefalina, un activador (caolin) e iones Ca^{2+} . La cefalina se obtiene de acuerdo al protocolo de Bell²²⁹. El KPTT se determina utilizando la técnica de Rappaport²³⁰. La prueba estudia globalmente calicreínas, quininógenos de alto peso molecular y los factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y I (estos dos últimos con poca sensibilidad). El valor de referencia (n=50) determinado en el laboratorio es 35-45 seg.

Tiempo de Trombina

Mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una cantidad fija de trombina. Estudia la cantidad y/o calidad del fibrinógeno presente. Se coagula plasma con una solución de trombina de aproximadamente 15 UI/ml (Trombina bovina Parker-Davis, USA). Se ajusta la concentración para que un plasma fresco coagule de

13 a 15 segundos. Se utiliza para investigar la presencia de heparina en las muestras y anomalías en la etapa de fibrinoformación ²³¹.

I.2.2- ENSAYOS FUNCIONALES DE LOS FACTORES DE COAGULACION

Determinación de fibrinógeno

Se utilizó el método funcional de Clauss (manual) en el que el tiempo de coagulación del plasma diluido en presencia de trombina es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno del plasma ²³². La técnica se realizó de acuerdo a las indicaciones del equipo comercial (Fibri prest, STAGO, Francia). La cantidad de fibrinógeno coagulable se expresa en mg/dl.

Dosaje de factores II, VII, V, X por el método coagulable

Mediante la técnica de dosaje de factores se determina, funcionalmente el porcentaje de actividad del factor presente en la muestra en estudio respecto a un plasma control o pool de plasmas normales ²³¹. Técnica: Diluir el plasma en estudio con solución fisiológica, considerando la dilución 1/10 como el 100% de actividad, se mezcla 100 µl de cada dilución con 100 µl de un plasma deficitario en el factor que se quiere estudiar (SIGMA Co, USA), se agrega 100 µl de tromboplastina, se recalifica con 100 µl de CaCl₂ 0.025M y se mide el tiempo de coagulación. Se realiza una curva de calibración con el pool normal (tiempo de coagulación vs. concentración del factor) y con el tiempo de coagulación de la muestra se interpola el % del factor en la misma. Se informa la actividad en % respecto al normal o en UI/ml, considerando que una unidad de factor corresponde a la cantidad funcional de ese factor que hay en 100 ml de plasma ²³¹.

Dosaje de los factores XII, XI, IX y VIII por el método coagulable

El principio de la determinación es el ya señalado para los otros factores; para dosar los factores XII, XI, IX y VIII se utiliza cefalina como activador²³¹.

Técnica: diluir el plasma en estudio con solución fisiológica, considerando la dilución 1/10 como el 100% de actividad.

Se mezcla 100 µl de cada dilución con 100 µl de un plasma deficitario en el factor que se quiere estudiar (SIGMA Co, USA) y 100 µl de la solución de cefalina, se agregan 100 µl de CaCl₂ 0.025M y se determina el tiempo de coagulación. Se extrapola de la curva tiempo de coagulación vs porcentaje de factor y se informa la actividad en % respecto al normal o en UI/ml.

I.2.3- DOSAJE DE LOS INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE COAGULACION

Determinación de antitrombina III

La actividad de antitrombina II (ATIII) se determina por un método amidolítico indirecto. Al reaccionar el plasma diluido con trombina (T) en presencia de heparina se forma el complejo T-ATIII(TAT) y queda T residual. La trombina en exceso actúa frente al sustrato 2238 (Chromogenix, Suecia) liberando p-nitroanilina (p-NA). La concentración de p-NA, determinada a 405nm, es inversamente proporcional a la concentración de ATIII en el plasma²³³.

La técnica se realizó según el protocolo del fabricante. La concentración de ATIII, determinada funcionalmente, se informa en porcentaje respecto a un plasma normal o en UI/ml de plasma.

Determinación de PC

La actividad plasmática de proteína C se determina por un método aminodolítico directo. En presencia de un activador específico, Agkistrodón contortrix, la proteína C del plasma es transformada en PC activada, cuya concentración es determinada por su actividad aminodolítica sobre el sustrato sintético CBS 42-46 (STACHROM PC STAGO, France) ²³⁵. La p-nitroanilina liberada se determina espectrofotométricamente.

La técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones del equipo comercial utilizado y la concentración de PC se informa en porcentaje respecto al valor normal o en UI/ml

Determinación de Proteína S

El ensayo se basa en la habilidad de la PS para actuar como cofactor de la PC activada, potenciando su efecto anticoagulante frente al factor V. Se determina el tiempo de coagulación de una mezcla que contiene el plasma incógnita diluido, PC activada, factor V y plasma normal deficiente en PC. El tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración PS en el plasma incógnito ²³⁶. La técnica se realiza según las instrucciones del fabricante (STACLOT Protein S, Diagnóstica STAGO, Francia).

Determinación de Cofactor II de la Heparina (HCII)

La actividad del cofactor II de la heparina se determina por un método amidolítico en 2 etapas ²³⁸. En una primer etapa se hace reaccionar el HCII del plasma, en presencia de dermatán sulfato (DS), con trombina en exceso y luego se mide la trombina residual haciéndolo reaccionar con sustrato específico de trombina.

Purificación de Dermatán Sulfato (DS)

Se tratan 100mg de DS tipo B de piel porcina (SIGMA Chem.Co. USA) con 30ml de una solución de NaNO_2 0.24M en ácido acético 1.8M durante 80 minutos, a temperatura ambiente²³⁷.

La solución de DS purificado se dializa durante toda la noche contra solución tampón-Tris-salina (Tris-HCl- 0.05M, NaCl 0.15 M pH 8). Se diluye hasta obtener una solución de trabajo de DS 0.5g/l en buffer Tris salino.

Determinación de la actividad de HCII

La dilución de un pool de plasma normales con buffer Tris-EDTA 1:50 se define como 100% de actividad de HCII; para realizar la curva estándar (Absorbancia vs % de actividad de HCII) se utilizan las diluciones 1:200, 3:200 y 1:40 que corresponden a 50%, 75% y 125% respectivamente.

Se colocan en tubos plásticos 200 μl de la solución de DS, se agregan 200 μl de cada una de las diluciones del pool de plasmas normales y la dilución correspondiente al 100% del plasma de paciente a cada uno de los tubos.

Se incuban a 37°C durante 5 min.

Se agregan 200 μl de Trombina humana (20 U/ml).

Se añaden 200 μl de sustrato H-D-Phe-Arg-pNA (S-2238, Chromogenix, Suecia).

A los 120 segundos exactos de la adición del sustrato, se interrumpe la amidolisis con el agregado de 400 μl de ácido acético 50%.

Se esperan 5 minutos. Se centrifugan a 3000 rpm 10 minutos.

La absorbancia del sobrenadante, leída espectofotométricamente a 405 nm, es inversamente proporcional a la concentración de cofactor II de la heparina.

Los resultados se informan en % respecto al plasma normal o en UI/ml

Valores de Referencia de Cofactor II de la Heparina en Capital Federal

Para determinar los valores de referencia del inhibidor se emplearon 150 muestras de plasmas citratados de 83 mujeres y 67 hombres, seleccionados de acuerdo a las

recomendaciones del Panel de Expertos en Teoría de Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica²²⁷.

Debido a que no existían datos sobre los valores de referencia para la actividad y la antigenicidad del cofactor II de la heparina para la población de Buenos Aires, se determinaron los mismos en 150 individuos seleccionados de acuerdo a las recomendaciones de los Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica (Valor ref). Los intervalos de referencia definidos por fractiles y determinados por métodos no paramétricos fueron 70-130% de actividad y 75-110% de antigenicidad. El rango de normalidad hallado para este inhibidor es considerablemente amplio, cuando se los compara con, los valores de referencia para otros inhibidores, por ejemplo antitrombina III cuyo valor de referencia es 80-100 y coincide con lo descrito para la población caucásica de Europa y Estados Unidos.

I.3-ESTUDIO DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

I.3.1-PRUEBAS DE GLOBALES

Lisis de euglobulinas

El método consiste en diluir el plasma del paciente en medio ácido para precipitar las euglobulinas que contienen plasminógeno, fibrinógeno y los activadores del plasminógeno (t-PA, scu-PA), mientras que los inhibidores del sistema fibrinolítico quedan en solución. El precipitado se redisuelve y es coagulado con Ca^{2+} , registrando el tiempo de lisis del coágulo formado. El tiempo de lisis del coágulo es inversamente proporcional a la actividad fibrinolítica plasmática.

Técnica:

Se mezcla por inversión

	V(ml)
Plasma citratado	0.5
Agua destilada	8.0
Acido acético	0.15

Se deja reposar 20 min. a 4°C.

Se centrifuga 5 min a 3000 rpm.

Se descarta el sobrenadante y se escurre los tubos sobre el papel de filtro.

Se redisuelve el precipitado en buffer borato (Borato 1M, pH 9) a 37°C, se coagula con trombina 20 UI/ml y se cronometra el tiempo de lisis total del coágulo.

Tiempo de lisis de un plasma normal > 120 minutos²³¹.

I.3.2-ENSAYOS FUNCIONALES DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLITICO

Determinación del plasminógeno (miniplasminógeno)

La actividad de plasminógeno se determina activándolo con streptokinasa en exceso y midiendo la actividad plasmínica generada por un método amidolítico²³⁸.

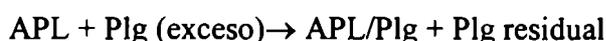
La actividad plasmínica (miniplasmínica) se determina por su acción amidolítica sobre HD-Val-Leu-Lys-pNA (Stachrom Plg, Diagnóstica STAGO, France) y sobre sustrato 2251 (Chromogenix, Suecia).

La p-nitroanilina liberada en ambos casos y determinada espectrofotométricamente a 405 nm, es directamente proporcional a la concentración de plasminógeno (miniplasminógeno) presente. Se hace una curva de calibración con plasminógeno puro (Chomogenix, Suecia) y una con un pool de plasma normales. Los resultados se expresan en % de Plg respecto al normal o en molaridad.

La técnica se realizó según las instrucciones de cada reactivo. Este procedimiento se utilizó para determinar miniplasminogeno.

Determinación de α_2 -antiplasmina

Los niveles plasmáticos de α_2 -antiplasmina (APL) se determinan con un método aminodolítico en dos etapas ²³⁹.



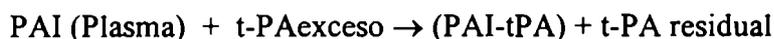
El plasma se mezcla con un exceso de plasminógeno; la cantidad de plasminógeno residual, determinada por un método aminodolítico es inversamente proporcional a la concentración de α_2 -antiplasmina. La concentración de α_2 -antiplasmina se expresa en % respecto al normal o en UI/ml.

La técnica se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante (Stachrom antiplasmin, Diagnóstica STAGO).

Determinación de PAI-1 actividad

La actividad del inhibidor de los activadores del plasminógeno se determina por un ensayo cromogénico en dos etapas [Spectrolyse (PL) PAI, Biopool, USA] de acuerdo a las instrucciones del equipo comercial. En la primera etapa se hace reaccionar el PAI contenido en la muestra plasmática con tPA en exceso durante 15 minutos a 25°C. El t-PA residual se determina por un método amidolítico ²⁴⁰.

La absorbancia a 405 nm es inversamente proporcional a la concentración de PAI-1.



I.3.3-DETERMINACIONES ANTIGENICAS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLITICO

Las concentraciones antigénicas de Plg y APL se realizaron por electroinmunodifusión (Rocket) utilizando un antisuero policlonal específico ²⁴¹.

Las concentraciones antigénicas de t-PA y PAI-1 se determinaron por enzimo-inmunoensayo Asserochrom tPA (Asserochrom PAI-1, Diagnóstica STAGO, Francia).

I.4- OTRAS DETERMINACIONES

El complejo trombina-antitrombina (TAT), marcador de la activación del sistema de coagulación, se determinó por enzimo-inmunoensayo tipo “sandwich” (Enzygnost TAT, Merck).

El complejo elastasa- α_1 inhibidor de proteinasa (EAPI), marcador de la degranulación neutrófila se determinó por enzimo-inmunoensayo utilizando un antisuero policlonal específico (Enzygnost EAPI, Merck).

El factor de necrosis tumoral TNF se determinó por enzimo-inmunoensayo realizado de acuerdo a las instrucciones del equipo.

El dosaje de dermatán sulfato plasmático se realiza en dos etapas: se adsorbe el plasma con una suspensión de bentonita para eliminar el cofactor II de la heparina, antitrombina III y fibrinógeno y el sobrenadante se incuba con cofactor II purificado y un exceso de trombina. La trombina residual se determina por su actividad

aminodolítica sobre el sustrato cromogénico CBS 61.50. La absorbancia, medida a 405 nm, es inversamente proporcional a la concentración de DS (242).

La determinación se realizó siguiendo el protocolo comercial (STACHROM DS, Diagnóstica STAGO). Los valores de referencia del DS se determinaron midiendo el DS plasmático en 40 plasmas de los utilizados para determinar los valores de referencia del cofactor II de la heparina.

I.5- TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

I.5.1- ANALISIS EXPLORATORIO DE LOS DATOS Y COMPARACION DE LAS POBLACIONES

El análisis exploratorio de los datos se realizó utilizando el procedimiento de Multiple Box & Whisker plot (Software STATGRAPHICS)²⁴³.

La comparación de las distintas variables entre los distintos grupos se realizó utilizando el método no paramétrico de Mann-Whitney (Software STATGRAPHICS)²⁴³.

El BOX-Plot es un gráfico que muestra la distribución de los datos representando el mínimo y el máximo, el primer y tercer cuarto y la mediana.

La caja central representa el 50% de los datos. Se puede así observar la distribución de los datos y detectar posibles valores extremos. El multiple Box & Whisker Plot permite representar en un mismo gráfico distintas distribuciones facilitando así una rápida comparación exploratoria.

I.5.2- DETERMINACION DEL MARCADOR PREDICTIVO DEL EVENTO FINAL: REGRESION LOGISTICA.

Fundamentos

La regresión logística (RL) permite calcular la probabilidad de que ocurra un hecho determinado (por ejemplo sobrevivida o muerte) en función de k variables que se presumen relevantes o influyentes^{244, 245}.

La probabilidad de que el evento ocurra puede expresarse como una función logística.

$$P(Y=1) = \frac{1}{1 + \exp(-\alpha - \beta_1 X_1 - \beta_2 X_2 - \dots - \beta_k X_k)}$$

donde $\alpha, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ son los parámetros del modelo; X_1, X_2, \dots, X_k son las variables explicativas o covariables y \exp denota la función exponencial.

Al construir el modelo de RL, las covariables pueden ser dicotómicas, ordinales, continuas o nominales.

El coeficiente β_i para una variable X_i es una medida del riesgo relativo inherente a poseer la condición X_i a los efectos de que ocurra el hecho descrito, suponiendo que el resto de las variables del modelo permanecen constantes.

Un valor mayor de β_i no indica un mayor peso de la variable X_i , ya que el solo hecho de usar unas u otras unidades en X_i produce cambios en los valores de los coeficientes.

Para cuantificar el aporte de cada X_i con fines comparativos se utiliza el coeficiente estandarizado definido por $b_i^* = b_i / s_i$, donde b_i es la estimación de β_i y s_i la varianza muestral correspondiente a la variable X_i .

Los coeficientes estandarizados se utilizan para comparar la magnitud de los efectos debidos a las diferentes variables sobre la probabilidad que se estima.

En general se acepta, aunque no es una regla formalmente fundamentada, que el número de sujetos para poder usar la RL sin problemas debe ser superior a $10(k+1)$, donde k es el número de covariables.

Además, si la variable de respuesta es dicotómica debe presentar al menos 10 casos con cada uno de sus dos valores posibles.

El número de pacientes (n=45) no alcanza para incluir todos los parámetros hemostáticos en la RL; por lo tanto se seleccionaron aquellas variables que mostraron diferencias significativas entre los sobrevivientes y no sobrevivientes.

Estas variables fueron: FX, FII, FIX, FVII, ATIII, PC, Plg y dentro de ellas se descartaron los factores k-dependientes por tratarse de parámetros modificables por la dieta a que son sometidos los pacientes y no por la sepsis.

Resumiendo, se intenta hallar la probabilidad de sobrevida de un paciente de acuerdo a la siguiente función:

$$P(S = 1) = \frac{1}{1 + \exp(-\alpha - \beta_1 \text{ATIII} - \beta_2 \text{PC} - \beta_3 \text{Plg})}$$

I.5.3- CURVA ROC (RECEIVING OPERATING CHARACTERISTIC)

Cuando la probabilidad de que ocurra un evento puede expresarse en función de uno o más covariables (X_i), es posible crear un mecanismo de clasificación en función del resultado probabilístico. En esos casos se puede fijar un valor $X_i = P_i$ denominado punto de corte tal que si para el i-ésimo sujeto $X_i < P$, la probabilidad de que ocurra se considera tan baja que se le pronostica el no evento.

Como consecuencia de aplicar tal mecanismo se producirán falsos positivos, (se les predice el evento, pero realmente no lo presentaron), falsos negativos (se les predice el no evento cuando realmente lo presentaron), además de aciertos en uno u otro sentido).

Así, para cada punto de corte P, se puede formar una configuración según la cual pueden clasificarse los datos de una muestra de acuerdo con el resultado real y vaticinado:

Producción	Realidad		Total
	Evento	No Evento	
Evento (X _i >P)	Verdaderos Positivos (a)	Falsos Positivos (b)	a + b
No evento (X<P)	Verdaderos Negativos(c)	Falsos Negativos(d)	c + d
Total	a + c	b + d	n

De aquí se puede calcular la sensibilidad y la especificidad como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{b}{b + d}$$

Las curvas ROC empíricas se construyen a partir de los valores de sensibilidad y especificidad usando los distintos puntos de corte ^{244, 245}.

En el eje de las abscisas se sitúa la probabilidad de un falso positivo (1-especificidad) y en el eje de ordenadas, la probabilidad de declarar como tal a un verdadero positivo (sensibilidad).

Se grafica para cada punto de corte el par (sensibilidad, 1-especificidad).

Una curva de ROC, mientras más próxima esté a la esquina superior izquierda del gráfico, más precisa es, debido a que la tasa de verdaderos positivos es uno y la tasa de falsos positivos es cero. Es decir que el área bajo la curva ROC da una medida de la capacidad predictora global de la función, ya que cuanto mayor sea esa área, mayor capacidad predictiva tendrá la función.

Cuando para iguales puntos de corte de una variable explicativa se pueden describir la probabilidad del evento por diversas funciones, la curva ROC sirve para comparar las distintas funciones predictivas. Para una función dada, el mejor punto de corte para la variable X_i será aquel que tenga mayor sensibilidad y especificidad.

En este estudio se realizó la curva ROC para intentar discernir qué variable dentro de los parámetros hemostáticos estudiados eran útiles para predecir la sobrevida o no del paciente.

II- DEGRADACION DEL PLASMINOGENO: MINIPLASMINOGENO

II.1- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PLASMINOGENO HUMANO

II.1.1-PURIFICACION DE PLASMINOGENO

El plasminógeno humano se obtiene a partir de plasma humano, por cromatografía de afinidad sobre lisina sefarosa ²⁴⁶.

Preparación de la columna de lisina-sefarosa: Se lava 1 gr de sefarosa, activada con CNBr (SIGMA Chemical Co., USA), con 100 ml de ácido clorhídrico 1mM, se resuspende y deja hidratar durante 15 minutos. Se lava con ácido clorhídrico y luego con el buffer de activación bicarbonato 0.1M cloruro de sodio 0.5M, pH 8.3. Se agita la sefarosa con la lisina (30mg/ml) durante 2 horas cabeza a cola; se filtra y el gel resultante se agita otras 2 horas con etanolamina 1M, pH 8. Finalmente se lava cíclicamente con buffer bicarbonato 0.1M cloruro de sodio 1M pH 9,2 y buffer acético/acetato 0.1M pH 4.

Se empaqueta la columna de 6 cm x 0,8 cm y se equilibra con buffer inicial (NaH₂PO₄/Na₂ HPO₄ 0.1M, EDTA 0.003M pH 7,4)

Proceso de purificación: a 10 ml de plasma, obtenido por punción venosa y anticoagulado con citrato de sodio y aprotinina, se le agregan 8 ml de agua destilada y 0.002 g de EDTA Na₂. Esta mezcla se siembra en la columna previamente equilibrada, se recoge el filtrado en fracciones de 2ml, a una velocidad de 4 gotas/min; las fracciones concentradas 2 meses, se utilizaron en ensayos posteriores como plasma libre de plasminógeno (se investigó la presencia de plasminógeno por Outcherlony con un antisuero policlonal antiplasminógeno).

Se lava la columna con buffer hasta obtener un filtrado cuya absorbancia a 280nm sea menor que 0.002. Finalmente se eluye con buffer fosfato 0,1M EDTA 0,2M pH 7.4, que contiene ácido ϵ aminocaproico monitoreando la absorbancia 280nm.

En los tubos que presentaron mayor absorbancia se investigó la actividad inmunológica de plasminógeno por inmunodifusión radial ²⁴³, la actividad funcional como ya se describió y la concentración de proteínas totales por el método de Lowry²⁴⁴.

Con los tubos que presentaron actividad se hace un pool y se guarda alicuotado a -20°C hasta su uso.

Con el Plg obtenido se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS para investigar el grado de pureza y estimar el peso molecular y un isoelectroenfoco en poliacrilamida para obtener el punto isoelectrico.

II.1.2- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

El gel de poliacrilamida (T=10%, C=2%, preparado según técnica de Laemmli) fue corrido hasta que el frente alcanzó la máxima distancia interelectrónica, a 180 Vts con una intensidad menor que 30mA y teñido posteriormente con Azul Brillante de Coonassie 5% (SIGMA Chemical Co., USA) durante al menos 12 hs. El gel se decolora y se seca entre papel celofán. Para estimar el peso molecular se utilizaron marcadores de peso molecular. Se graficó el cuadrado de la distancia, entre el comienzo del gel separador y la posición de la banda, en función del peso molecular de los estándares y se extrapoló el PM de la muestra de acuerdo a la distancia recorrida ²⁴⁹. La determinación se repitió tres veces.

II.1.3- ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para realizar el isoelectroenfoque se prepararon geles de acrilamida T= 4,5% y distintas concentraciones de anfolito rango de pH 3-10 (Pharmalyte 3-10, Pharmacia, Suecia). Los geles se prepararon incubando solución de acrilamida, glicerol, agua y anfolito (rango 3-10) y persulfato de amonio de acuerdo a la técnica de Righetti. Se trabajó con distintas condiciones eléctricas (voltaje, intensidad y potencia) hasta lograr tener un gradiente de pH estable y con buena resolución. Las condiciones eléctricas óptimas encontradas fueron: Potencia max.: 8 watts, voltaje max. 1.500 volts e intensidad maxima 15 mA; temperatura 8°C y se aplicaron 3500 volts horas en todas las placas. Luego de finalizada la corrida, se cortó una zona del gel en áreas de 1cm² desde el cátodo hacia el ánodo, las cuales se eluyeron con cloruro de potasio 1M y se midió el pH de cada solución resultante²⁵⁰. La zona de la placa restante se fijó con una solución de ácido tricloroacético 10%, ácido sulfosalicílico 5% durante 30 minutos, se lavó y se tiñó con Azul Brillante de Coomasie. Con los datos obtenidos se realizó una curva de pH vs distancia de donde de acuerdo a las distancias de cada muestra se extrapoló el punto isoeléctrico .

II.2.- DEGRADACION DEL P1g POR LA ACCION DE LA ELASTASA PURA: OBTENCION DE MINIPLASMINOGENO

II.2.1- DOSAJE DE LA ACTIVIDAD DE ELASTASA

Método amidolítico

La actividad de la elastasa leucocitaria pura (SIGMA Chemical Co., USA) se determina por su efecto amidolítico sobre el sustrato Pyro-Glu-Pro-Val-pNA, específico para elastasa (S-2484, Chromogenix, Suecia). La concentración de p-

nitroanilina, medida espectrofotométricamente a 405nm, es proporcional a la concentración de elastasa. La técnica se realizó según las instrucciones del fabricante.

Método con N-BocAla

La actividad proteolítica de la elastasa se midió espectrofotométricamente usando N-Boc-Ala-NP²⁵².

Se realizó una curva de calibración con 5,10,15 y 20 µg de elastasa leucocitaria estandar respectivamente, se incubaron 100 µl de N-Boc-Ala-NP 10⁻²M en metanol con 2900 µl de buffer fosfato 0,05M pH 6,5 y de 10 µl de muestra y se monitorea la variación de la absorbancia (ΔAbs/min).

De la curva ΔAbs vs concentración se extrapoló la concentración de elastasa de la solución incógnita.

II.2.2- ACCION DE LA ELASTASA LEUCOCITARIA SOBRE EL PLASMINOGENO HUMANO PURIFICADO

Se incubaron a 37°C distintas relaciones Plg/elastasa leucocitaria humana (mg de Plg/elastasa: 2,2µM/1UI, 1,1µM/1UI, 1,1µM/2UI) y se tomaron alícuotas a las 2, 4 y 24 horas de colocados en el baño. En un tubo adicional se coloca plasminógeno, elastasa y α₁- inhibidor de proteinasa en exceso (20UI/ml). Al tiempo establecido se inhibió la reacción con fenilmetil sulfonil fluoruro PMSF (10mM en dimetilsulfóxido) y se almacenó cada alícuota a -20°C.

La acción proteolítica de la elastasa sobre el plasminógeno se investigó mediante la técnica SDS-PAGE/Western blot, utilizando anticuerpo policlonal antiplasminógeno y anticuerpo monoclonal selectivo para miniplasminógeno (reconoce sólo al kringle 5).

II.2.3- OBTENCION Y CARACTERIZACION DEL MINIPLASMINOGENO

Se incubó plasminógeno purificado 1,1 μ M con elastasa leucocitaria humana (10UI/ml) (SIGMA Chemical Co., USA) durante 4 horas. La reacción se detuvo con el agregado de PMSF.

La solución resultante fue diluída con buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ 0.1M EDTA 0,003M pH7,4 y sembrada en una columna de lisina-sefarosa. Se recogieron los filtrados en fracciones de 2 ml, se lavó las columnas con buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ 0,3M EDTA 0.003M pH7,4 hasta que la absorbancia a 280 nm fuera menor que 0.02. Por último se eluyó la columna con buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$, 0.1M EDTA conteniendo ácido ϵ aminocaproico 0,2M pH 7,4.

En el pool de filtrados se determinó la actividad amidolítica frente a un sustrato específico de plasmina y la concentración antigénica frente a un antisuero monoclonal selectivo para miniplasminógeno (American Diagnostic).

Se determinó la concentración de proteínas del pool de filtrados y se realizó SDS-PAGE seguido de Western blot, para determinar el peso molecular y un isoelectroenfque para investigar el punto isoelectrico del miniplasminógeno^{249, 250}.

II.3-DEGRADACION DEL PLASMINOGENO POR EL EXTRACTO DE ENZIMAS LEUCOCITARIAS

II.3.1-PREPARACION DEL EXTRACTO DE ENZIMAS LEUCOCITARIAS

Los leucocitos se aislaron a partir de un concentrado de blastos obtenidos por plasmáféresis según el procedimiento de Bough y Travis²⁵³. Las preparaciones de leucocitos se resuspenden en KCl 0.15M y la mezcla se centrifuga a 1000g. Se eliminan los eritrocitos contaminantes por lisis hipotónica; se repite varias veces

hasta eliminar totalmente los glóbulos rojos. Se centrifuga y resuspende el “pellet” en 500ml de una solución que contiene 1mg/ml de heparina sódica en sacarosa 0.2M. Se agita la mezcla en hielo durante 2 horas.

El lisado celular se centrifuga a 15.000g por 60 minutos. Los gránulos (contenidos en el pellet) se resuspenden en sacarosa 0.34M y se centrifuga a 15.000g por 60 minutos. El pellet se resuspende en acetato de sodio 0,2M pH4 y se homogeneiza con un Potter-Elvehem de vidrio. El extracto de los gránulos se centrifuga a 15000g 10 minutos y el pellet es rehomogeneizado tres veces. Se determina la actividad de elastasa en el extracto leucocitario, se concentra hasta obtener una actividad enzimática de 1 UI/ml, se alícuota y almacena a -20°C hasta su utilización. La actividad de elastasa frente al sustrato cromogénico se utiliza como un índice de actividad enzimática del extracto leucocitario.

II.3.2-ACCION DEL EXTRACTO LEUCOCITARIO SOBRE EL PLASMINOGENO

Se incubaron a 37°C plasminógeno 1,1 μ M (aproximadamente la concentración plasmática) y extracto leucocitario en distintas proporciones: 10:1, 20:1 y 5:1 vol Plg/UI elastasa. De cada mezcla se tomaron alícuotas a las 2, 4 y 24 horas de iniciada la incubación, se frenó la actividad enzimática con PMSF en dimetilsulfóxido y se almacenaron las alícuotas a -20°C. Para comprobar si la actividad proteolítica era inhibida por inhibidor de proteasa, se realizó una incubación de plasminógeno con extracto leucocitario en presencia de un exceso de α_1 inhibidor de proteinasa

II.4-PROTEOLISIS DEL PLASMINOGENO IN VITRO POR POLIMORFONUCLEARES DEGRANULADOS

II.4.1- OBTENCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES

Los polimorfonucleares se aislaron a partir de sangre humana normal por el método de Boyum modificado, utilizando centrifugación diferencial²⁵⁴. Se diluyó la sangre al medio con buffer fosfato salino y EDTA, Cf 20mM. Se agregó dextrán 500.000 (Cf=1%) y se dejó sedimentar los eritrocitos durante 30 minutos. El sobrenadante se coloca en un gradiente de Ficoll-Hypaque δ 1.077 y se centrifugó 20 minutos a 2000g. Se eliminaron los eritrocitos del pellet por lisis hipotónica. Se resuspende el pellet en buffer fosfato que contiene CaCl_2 1mM, MgCl_2 1mM y glucosa 5mM. Se cuenta el número de neutrófilos por microscopia óptica y se estudia la viabilidad por el test de exclusión de Azul Tripán. Se ajusta la concentración celular a $1,5 \cdot 10^8$ cel/ml.

II.4.2-DEGRANULACION DE LOS POLIMORFONUCLEARES EN PRESENCIA DE PLASMINOGENO

Dos volúmenes de PMN (10^8 cel/ml) se preincubaron 1 minuto con citocalasina B ($10\mu\text{M}$) y se incubaron con un volumen de:

- | | |
|-----------------------------|---|
| A) Plasminógeno puro 1mg/ml | C) Plasminógeno 0,2 mg/ml |
| B) Plasma humano normal | D) Plasminógeno 1mg/ml y α_1 inhibidor de
proteinasas (6 mg/ml) |

Todas las muestras fueron estimuladas con FMLP ($33 \mu\text{M}$) e incubadas a 37°C durante 15 horas, después de la cual la reacción fue inhibida con PMSF; se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a -20°C .

La presencia de plasminógeno y sus fragmentos proteolíticos se investigó por SDS-PAGE y Western blot usando un anticuerpo policlonal anti-plasminógeno humano.

II.4.3- DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE DEGRANULACION

El porcentaje de secreción se calcula en base a la actividad de las proteínas liberadas de los gránulos presentes en el sobrenadante (sob) y a la actividad de las proteínas liberadas dosables en el pellet ²⁵⁵. El porcentaje de degranulación se calcula como:

$$\% \text{ Degranulación} = \frac{\text{Act sob}}{\text{Act. sob} + \text{Act. pellet}} \cdot 100$$

Para calcular el porcentaje de degranulación se determinó la actividad de mieloperoxidasa y de elastasa, enzimas marcadoras de degranulación de gránulos primarios.

II.4.4- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA (MPO)

La actividad de esta enzima se determina midiendo espectrofotométricamente la peroxidación del guayacol por el peróxido de hidrógeno ²⁵⁵.

Colocar el sustrato (0,3mM de guayacol, 0,2mM de H₂O₂ y 0,1% de Tritón X100) en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4. El sustrato debe prepararse en el día y mantenerse a 37°C hasta su utilización. Se agrega la muestra a una de las cubetas y se registra la absorbancia a 436 nm durante 2 minutos. Se toma la pendiente inicial de la curva en Abs/min y se calcula la actividad enzimática.

II.5- INVESTIGACION DE LA PRESENCIA DE MINIPLASMINOGENO EN EL PLASMA DE PACIENTES SEPTICOS.

Los plasmas de los pacientes sépticos fueron diluidos con buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ 0.1M EDTA 0.003M pH 7,6 y filtrados por las columnas de lisina- sefarosa. Cada uno de los filtrados fue concentrado por membranas de Amicon y se investigó la presencia de miniplasminógeno por SDS-PAGE/Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal, selectivo para miniplasminógeno y un anticuerpo policlonal antiplasminógeno humanos.

III- ACTIVIDAD FIBRINOLITICA DEL MINIPLASMINOGENO

III.1- ACTIVIDAD DE PLASMINA Y MINIPLASMINA SOBRE UN COAGULO DE FIBRINA FRESCO

Para obtener miniplasmina y plasmina se incubaron 50 μ l de Plg (1,1 μ M) o miniPlg (1,1 μ M) con 50 μ l de uroquinasa 100 U/ml (Ukidam, Serono) y 25 μ l de glicerol durante 4 horas a 37°C²⁰³. El 95% del zimógeno es convertido a la enzima activa, plasmina y miniplasmina respectivamente, cuando la reacción es monitoreada por la actividad amidolítica de plasmina (miniplasmina). Las mezclas alicuotadas se guardaron a -20°C.

Se determinó la actividad de plasmina y miniplasmina sobre un coágulo de fibrina fresco formado al mezclar 50 μ l de fibrinógeno libre de plasminógeno 1 mg/ml (Laboratorios Cutter, Suiza) y 50 μ l de trombina bovina 30 UI/ml (Mediatech, USA). Se prepararon varios tubos que contenían el coágulo recientemente formado. Se agregó a cada uno distintas concentraciones de plasmina (o miniplasmina), simultáneamente al agregado de la enzima se disparó el cronómetro y se registró el tiempo de lisis total del coágulo.

Se realizó la misma experiencia pero preparando el coágulo en presencia de plasmina o miniplasmina. Se incuban 50 μ l de fibrinógeno libre de plasminógeno con distintas volúmenes (0,1-2,4) μ l de plasmina (o miniplasmina) y se dispara el cronómetro cuando se agregan 50 μ l de trombina bovina 30 UI/ml, la concentración de trombina utilizada es tal que el coágulo se forma instantáneamente. Cada experiencia se realiza por triplicado y se grafica el tiempo de lisis promedio vs. la concentración de plasmina o miniplasmina.

II.2- ACTIVIDAD AMIDOLITICA DE MINIPLASMINA SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS CROMOGENICOS

Se incubaron a 37°C miniplasmina (o plasmina) con tres sustratos cromogénicos diferentes, el M.M L.Tyr-Arg pNA (CBS 33.08) (Diagnostica STAGO, Francia) y H-DVal-Leu-LyspNA (S-2251-Chromogenix, Holanda) y H-D-Phe-Pip-ArgpNA (S-2238 - Chromogenix, Holanda) registrando las variaciones de absorbancia/min. Se utilizaron 8 concentraciones distintas de cada sustrato cromogénico. Se calcularon las velocidades iniciales y se determinó la constante de Michaelis-Menten (Km) y la constante catalítica (Kc) de plasmina y miniplasmina por el método Lineweaver - Burk.

III.3-ACTIVACION DE LA MINIPLASMINA POR UROQUINASA

Se incuban en una cubeta 100 µl de plasminógeno (1,1 µM) (o miniplasminógeno) con 30 y 10 unidades respectivamente de uroquinasa (Ukidam, Serono) y el sustrato Val-Leu-Lys-pNA (Cf=0,60 nM). Las diluciones se realizan con un buffer fosfato salino pH7,4 conteniendo 0,006% Twcen 80. La formación de p-nitroanilina se monitorea espectrofotométricamente. La plasmina generada se calcula como:

$$Plm = \frac{\Delta Ab_{405nm}}{\Delta t} \frac{S_0 + Km}{k_{cat} S_0}$$

donde pNA es el incremento de p-nitroanilina en 120 segundos y S_0 la concentración del sustrato cromogénico usado en cada ensayo ²⁰². La Kc y el Km son los determinadas en el ensayo anterior. La actividad amidolítica de la uroquinasa y el plasminógeno o miniplasminógeno sobre el sustrato cromogénico no es significativo en las condiciones del ensayo.

III. 3.1- EFECTO DEL FIBRINOGENO

Se incuban en una cubeta plasminógeno o miniplasminógeno, el sustrato Val-Leu-Lys-pNa y fibrinógeno libre de plasminógeno (0,50; 1,5; 4,5 μ M) y uroquinasa.

El fibrinógeno aumenta la turbidez de la solución. Para descontar la interferencia se mide la absorbancia a 405 y a 435 nm, de tal forma que la concentración de pNA a un tiempo dado se calcula a partir del $\Delta Ab = A_{405} - A_{435}$ ²⁰².

La utilización de esta longitud de onda permite máxima sensibilidad y mínima interferencia por turbidez.

III.3.2- EFECTO DE LA FIBRINA

Coagular 50 μ l de fibrinógeno (0,1mg/ml) con 10 μ l de trombina (5 NIH/ml), centrifugar descartar el sobrenadante, lavar con solución fisiológica y secar en estufa a 37°C durante 15 horas. La película obtenida se almacenó a temperatura ambiente durante más de una semana. A cada uno de los tubos que contenía la película de fibrina se agregó plasminógeno (o miniplasminógeno), uroquinasa y Val-Leu-Lys-pNA en las concentraciones ya señaladas. Se monitoreó la absorbancia a 405 nm (restando la absorbancia que presenta la cubeta con la película de fibrina). Se calcula la concentración de plasmina en función del tiempo. Los ensayos con fibrinógeno y las películas de fibrina se realizaron con (1 nM) y sin ácido ϵ aminocaproico (EACA).

III.4- ACTIVACION DE MINIPLASMINÓGENO POR ESTREPTOQUINASA

Las mismas determinaciones realizadas en III.3. se realizaron utilizando estreptoquinasa (Streptokinase, Stochrcm Plg. Diagnostica STAGO) como activador del plasminógeno. La concentración de estreptoquinasa utilizada fue

III.5- ACTIVACION DEL MINIPLASMINOGENO POR t-PA RECOMBINANTE (rt-PA)

Mezclar en una cubeta 100 μ l de plasminógeno (Cf=0.5 20 μ M) o mimiplasminógeno (0,5-20 μ M) con 100 μ l rt-PA (Cf=0,5-20UI) (Genetech INC. USA, Actividad específica 500.000 UI/Im), 100 μ l Val-Leu-Lys-pNA (S-2251, Chromogenix, Suecia) y la pNA generada se monitorea espectrofotométricamente. Se calcula la concentración de plasmina como se indicó anteriormente. Las diluciones se realizaron en PBS conteniendo Tween 0,006%. Las propiedades bioquímicas y biológicas de rt-PA son similares a las del activador tisular aislado de utero (Collen et al, no publicado). Incubando rtPA con S-2251 no se observa liberación de p-nitroanilina.

III.5.1- EFECTO DE FIBRINOGENO, LOS MONOMEROS SOLUBLES DE FIBRINA Y LA FIBRINA

Los monómeros de fibrina se preparan coagulando 1 ml de fibrinógeno libre de plasminógeno (1 mg/ml) con reptilase (Diagnostica, STAGO, Francia) luego se estruja el coágulo y se lava con solución fisiológica 4 veces; los monómeros se disuelven en 1 ml de urea 7M y se mantiene la solución a -20°C hasta su utilización.

Para el efecto sobre la activación del miniplasminógeno mediado por r-tA de los monómeros solubles de fibrina y el fibrinógeno se incuban en una cubeta 100 µl de plasminógeno o miniplasminógeno (Cf=0.5-20 µM), con 100 µl de rt-PA (55-10 µ/ml) y 10 µl de buffer ó 10 µl de monómeros solubles de fibrina (1mg/ml) ó 10 µl de fibrinógeno (1 mg/ml) y 100 µl de S-2251. Se registra la absorbancia a 405 y se calcula la concentración de plasmina según la descrita en III.3.

Para estudiar el efecto de la fibrina sobre la activación se colocan en tubos que contienen las películas de fibrina 100 µl de plasminógeno o miniplasminógeno (Cf=0,5-20 µM), 100 µl de rt-PA (10U/ml) y 10 µl de buffer y 100 µl de S-2251. Se registra la absorbancia a 405 nm y se calcula la concentración de plasmina.

III.6-COMPARACION DEL EFECTO FIBRINOLITICO DEL PLASMINOGENO Y MINIPLASMINOGENO EN SISTEMAS PURIFICADOS Y EN MEDIO PLASMATICO

Se utiliza como plasma libre de plasminógeno, el plasma filtrado por la columna de lisina sefarosa y concentrado dos veces con membrana de diálisis.

En el plasma depletado se investiga la presencia de Plg por el método de Outcherlony utilizando un antisuero policlonal anti-plasminógeno humano (Diagnostica STAGO, Francia).

Se coagulan instantaneamente 50 µl de plasma libre de plasminógeno o fibrinógeno puro libre de Plg (1 mg/ml) con trombina humana en presencia de Plg o miniPlg (Cf: 1,2 µM, la concentración plasmática) y r-tPA (Cf=5 UI/ml). Se registra el tiempo de

lisis completa en cada caso y se informa el tiempo de lisis promedio. A distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar la concentración de Dímeros de D, por enzimoimmunoensayo. La técnica se realiza de acuerdo al protocolo del equipo comercial. Cada ensayo se realizó por triplicado y se informa el promedio \pm la desviación standard.

III.7- DETERMINACION DE LOS TIEMPOS DE LISIS EN PLASMA DE PACIENTES SEPTICOS LIBRE DE PLASMINOGENO

Los plasmas de los pacientes sépticos diluidos con buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4 / \text{HNa}_2\text{PO}_4$ 0,1M, EDTA 0,003M pH filtrados por la columna de lisina-sefarosa que no mostraron banda de miniplasminógeno por Western Blot fueron coagulados con trombina humana en presencia de Plg (1,2 μM), o miniplasminógeno (Cf 1,2 μM) y rt-PA. Simultáneamente al agregado de trombina se disparó el cronómetro y se determinó el tiempo de lisis total. Cada determinación se realiza por triplicado.

Resultados

y

Conclusiones

I- EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA EN SEPSIS

I.1-POBLACION Y TRATAMIENTO

La sepsis es una respuesta inflamatoria generalizada inducida por una infección^{211,213}. En el curso del proceso séptico se produce la activación de numerosos sistemas plasmáticos (coagulación, quininas y calicreínas, fibrinolítico, complemento) y celulares (granulocitos, monocitos, células endoteliales). Dada la interrelación dinámica que existe entre estos sistemas, el perfil hemostático de estos pacientes es complejo, varía durante el curso del episodio séptico y depende de la terapéutica aplicada^{218,225}. En este trabajo se estudiaron los parámetros hemostáticos a través de estudios globales y específicos en forma seriada de un grupo de pacientes sépticos (GS), comparándolos con un grupo control de sujetos normales (GN) y un grupo internado en la misma unidad de terapia intensiva sin manifestaciones clínicas de sepsis (GCT).

El grupo séptico (GS) está constituido por 45 pacientes consecutivos con el diagnóstico de sepsis de acuerdo al criterio establecido en materiales y métodos.

Los pacientes sépticos recibieron antibióticoterapia apropiada, minidosis de heparina no fraccionada como profilaxis y no ingirieron suplemento de vitamina K. Ningún paciente presentó evidencias clínicas de coagulación intravascular diseminada y las muestras fueron recogidas los días 1 (día del diagnóstico de sepsis), 3 y 7 entre las 8 y 10 hs. de la mañana.

El índice APACHE II fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en los pacientes que no sobrevivieron. 18 de los 45 pacientes murieron a causa del episodio séptico con un tiempo de sobrevida mayor a 9 (7-16) días (mediana y rango).

	GRUPO SEPTICO	
	SOBREVIVIENTES	NO SOBREVIVIENTES
Nro. de Pacientes	27	18
Sexo: femenino	11	7
masculino	16	11
Edad: años (mediana y rango)	50 (38-69)	61 (42-72)
APACHE II	8 (4-10)	17 (14-20)
Fuente de Infección: Pulmonar	7	8
Urogenital	5	3
Abdominal	11	6
Miscelánea	5	1
Hemocultivos: Gram negativos	6	7
Gram positivos	2	2
Levaduras	--	1
Ninguno	19	8
Leucocitos (10^9 cel/l)	12 (6-25)	22 (9-44)

El grupo control terapia (GCT) está constituido por 17 pacientes (9 hombres y 8 mujeres) con accidente cerebrovascular, internados en la misma unidad de terapia intensiva. La mediana y rango de la edad fue 52 (30-68) años, el índice APACHE II de 10 (6-16); ningún paciente presentó síntomas clínicos de sepsis durante el estudio y no recibieron vitamina K como suplemento de la dieta.

Este grupo constituyó un grupo control que refleja, en parte, la variabilidad de los parámetros hemostáticos del paciente por estar internado en la unidad de terapia intensiva.

I.2-ESTUDIO DE LOS COMPONENTES PLASMATICOS DEL SISTEMA DE COAGULACION

Los pacientes sépticos mostraron un tiempo de Quick significativamente disminuido 45 (30-90)%; (mediana y rango); el control terapia presentó valores de 60 (38-100)% y el grupo control normal 100(95-100).

Los niveles plasmáticos de los factores vitamina K dependientes FII, FVII, FIX y FX están significativamente disminuidos ($p<0,01$) en los pacientes internados en la unidad de terapia intensiva (GS y GCT) con respecto al grupo control normal, aunque los pacientes sépticos presentan valores ligeramente menores ($p<0,05$ entre ambos grupos de terapia) (Tabla I.2.1 y Fig. I.2.1).

Este hecho se debería a la falta de ingesta de vitamina K que sufren los pacientes internados en unidades de terapia intensiva. Cuando los factores K dependientes se estudiaron en forma seriada, al día 1, 3 y 7, se observó que los pacientes que no sobrevivieron al evento séptico presentaron valores de actividad, de los mencionados factores, menores que los sobrevivientes (Tabla I.2.2). Los pacientes sépticos mostraron niveles de fibrinógeno plasmático significativamente altos respecto al grupo de pacientes internados en terapia y al grupo de controles sanos ($p<0,01$). La alteración de los niveles de fibrinógeno podría deberse a que es una de las proteínas plasmáticas que aumentan en los procesos inflamatorios agudos, denominadas reactantes de fase aguda. Cuando estos parámetros se estudian a los días 1,3 y 7 se observó que el fibrinógeno tiende a aumentar hacia el día 7 en los pacientes que no sobrevivieron al evento séptico, pero esa diferencia no es significativa entre los pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes.

Los niveles plasmáticos de los inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación, antitrombina III, proteína C, proteína S y cofactor II de la heparina están disminuidos significativamente en los pacientes sépticos (Tabla I.2.1). La concentración plasmática de antitrombina III está significativamente

disminuida respecto al grupo control terapia y al grupo normal ($p < 0,001$). La proteína C y la proteína S están significativamente disminuidos en ambos grupos de pacientes respecto al grupo control sanos pero no respecto al grupo de pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva. La síntesis de estos inhibidores es dependiente de la vitamina K, por lo tanto es probable que el descenso se deba, parcialmente, a la falta de ingesta de vitamina K en la dieta. Las determinaciones seriadas de antitrombina III, proteína C y proteína S muestran que existen diferencias significativas en los niveles de actividad plasmáticos de proteína C y antitrombina III entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes ($p < 0,001$; Tabla I.2.2). La actividad de HCII está significativamente disminuída respecto a ambos grupos controles ($p < 0,001$). Si bien los niveles de cofactor no se determinaron en forma seriada, existen diferencias significativas al día 1 entre los niveles de actividad del HCII en los pacientes que sobrevivieron y los que murieron (Tabla I.2.2). El descenso de los niveles de cofactor II de la heparina podría deberse a un mayor consumo del inhibidor al estar presente su potenciador, el dermatán sulfato, en el plasma de los pacientes sépticos. Los niveles plasmáticos de complejo trombina-antitrombina III (TAT), marcador de activación del sistema de coagulación, están significativamente elevados respecto al grupo control terapia y al grupo normal ($p < 0,001$, Tabla I.2.1). Al día 1 no existen diferencias significativas entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes; la concentración del complejo no fue determinada en los días restantes.

De los datos expuestos se deduce que los pacientes sépticos presentan un estado hipercoagulable, marcado por niveles altos de fibrinógeno, del complejo trombina-antitrombina y niveles plasmáticos disminuídos de antitrombina III, cofactor II de la heparina, proteína C y proteína S. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Hesselvik ²¹⁸, Philippé ²²⁰, Llorente ²²¹ y Massignon ²²³, entre otros, quienes encuentran un estado hipercoagulable en los pacientes sépticos definidos con el mismo criterio que los incluídos en este estudio.

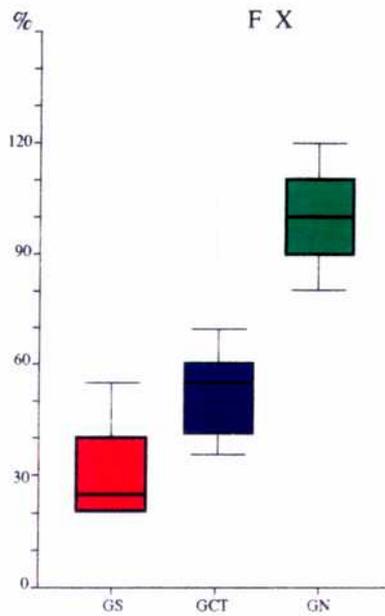
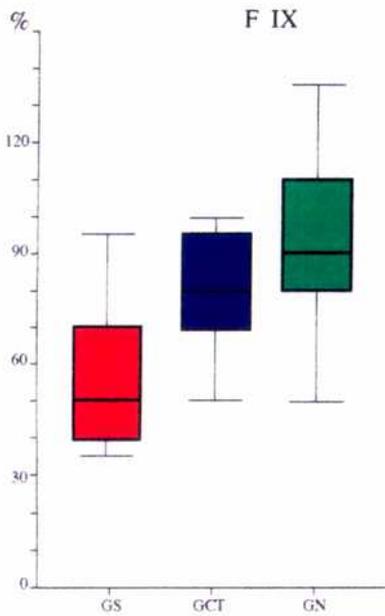
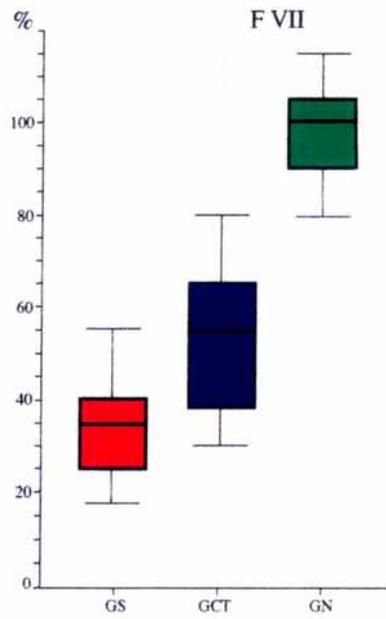
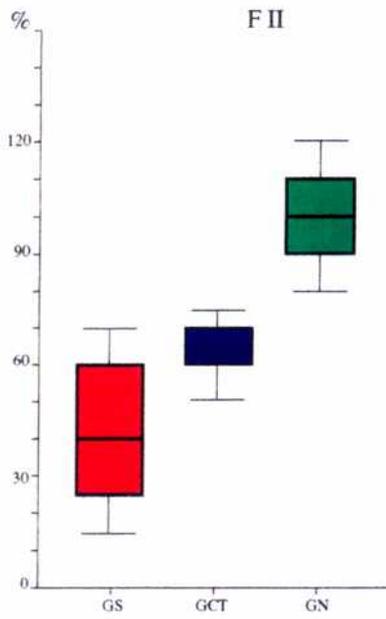


Fig. I. 2.1 - Análisis exploratorio de los factores de coagulación K-dependiente (Múltiple Box and Whisker plot).

GS: Grupo Séptico.

GCT: Grupo Control Terapia.

GN: Grupo Normal.

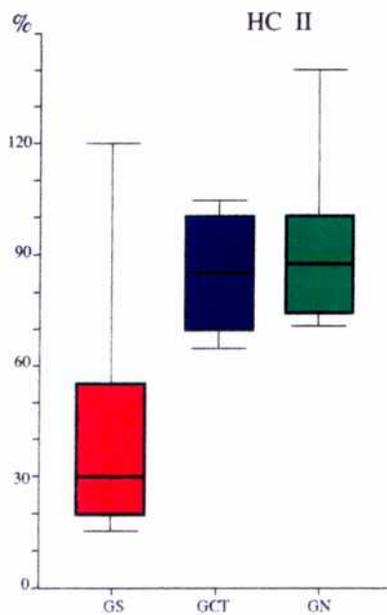
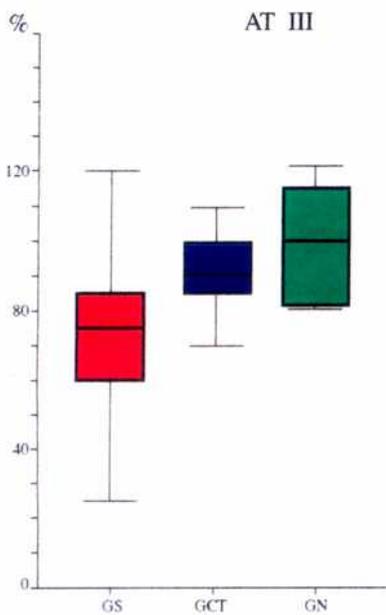
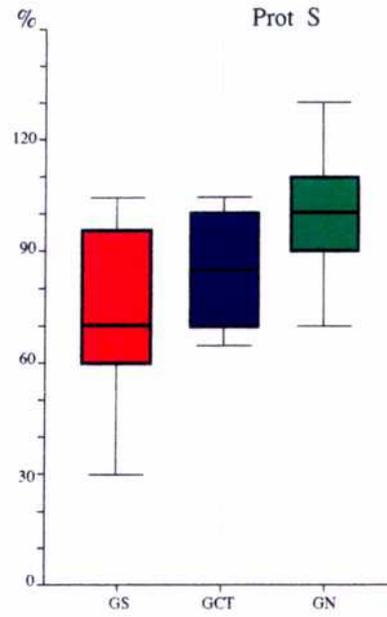
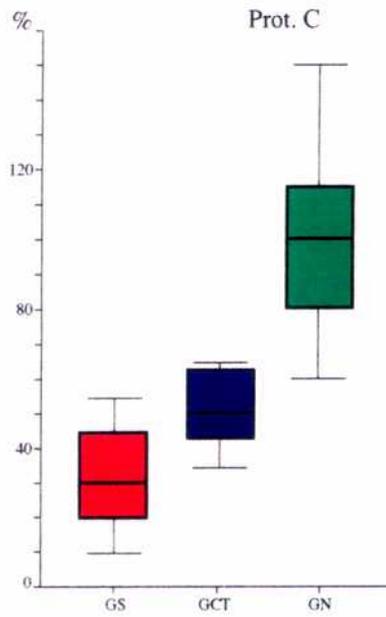


Fig. I. 2.2 - Análisis exploratorio de los inhibidores fisiológicos del Sistema de Coagulación del día 1 (Múltiple Box and Whisker plot).
 GS: Grupo Séptico.
 GCT: Grupo Control Terapia.
 GN: Grupo Normal.

	Grupo Séptico n=45	Grupo Control Terapia (n=17)	Grupo Control Normal (n=30)
Tiempo Quick %	45 (30-90)	60 (38-100)•	100 (95-100)
Fibrinógeno g/l	4,6 (2,1-8,0)*	3,0 (2,0-4,4)	3,0 (2,0-4,0)
F II %	30 (25-60)•	60 (55-70)•	100 (90-110)
F VII %	35 (25-40)•	54 (40-65)•	95 (90-100)
F IX %	50 (40-65)•	80 (65-95)•	90 (80-110)
F X %	25 (20-40)•	55 (40-60)•	95 (90-110)
Antitrombina III %	71 (25-140)**	90 (70-110)	100 (80-120)
Proteína C %	49 (10-95) ##	50 (35-85)##	100 (70-140)
Proteína S %	81 (41-110) #	80 (65-100)#	100 (70-140)
Cofactor II de la heparina %	29 (15-120)**	85 (80-110)	92 (75-110)
TAT µg/ml	7,9(5,2-10,6)**	2 (1,8-5,2)	1,5 (1-4,1)

Tabla I.2.1 Parámetros del sistema de coagulación al día 1, en los pacientes sépticos, pacientes control terapia y controles sanos.

Los resultados son expresados en mediana y rango (entre paréntesis)

• $p < 0.01$ diferencias entre Grupo Control Terapia y Grupo Séptico respecto del Grupo Control Normal.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$: diferencias entre Grupo Séptico y ambos Grupos Controles (Control Terapia y Normal)

$p < 0.005$; ## $p < 0.001$: diferencias entre Grupo Séptico y Grupo Control Terapia respecto del Grupo Control Normal

	Pacientes	Día 1	Día 3	Día 7
Fibrinógeno (g/l)	S	5.0 (2.5-8.0)	4.3 (2.0-6.4)	4.0 (2.0-6.9)
	NS	4.4 (2.1-8.0)	3.0 (2.6-9.0)	5.4 (2.6-6.6)#
F II (%)	S	60 (35-80)*	70 (30-90)*	70 (23-80)*
	NS	45 (10-80)	40 (10-70)*	42 (10-65)*
F VII (%)	S	50 (30-85)*	50 (30-85)*	60 (23-85)*
	NS	32 (13-80)	35 (15-70)*	35 (10-65)*
F IX (%)	S	80 (35-110)*	80 (7-110)*	80 (25-110)*
	NS	52 (35-100)	50 (30-85)*	60 (20-100)
F X (%)	S	45 (25-90)	52 (35-95)	65 (25-90)
	NS	30 (20-90)	35 (15-70)	32 (15-90)
Antitrombina III	S	85 (35-140)*	100 (35-140)*	100 (35-138)*
	NS	58 (25-110)	65 (16-100)	70 (25-110)
Proteína C	S	50 (15-80)*	50 (15-90)*	55 (15-100)*
	NS	37 (10-95)	30 (5-70)	35 (25-100)
Proteína S	S	87 (47-105)	90 (65-105)	80 (83-105)
	NS	75 (41-110)	80(30-105)	70 (30-100)
Cofactor II de la heparina	S	82 (50-120)*	No determinado	No determinado
	NS	30 (15-80)		

Tabla I.2.2: Parámetros del sistema de coagulación. Comparación entre pacientes sobrevivientes (S) (n=27) y no sobrevivientes (NS) (n=18). Los resultados están expresados en mediana y rango (entre paréntesis)

* p< 0.001, diferencia significativa entre sobrevivientes y no sobrevivientes

p< 0.001 comparado con el día 1

I.3- ESTUDIO DE LOS COMPONENTES PLASMATICOS DEL SISTEMA FIBRINOLITICO

Se han determinado los niveles plasmáticos de plasminógeno, α_2 -antiplasmina, activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el inhibidor de los activadores del plasminógeno tipo-1 (PAI-1). La fig. I.3.1 muestra el análisis exploratorio de datos por Multiple Box & Whisker Plot de todos los parámetros del sistema fibrinolítico en los tres grupos estudiados. La actividad de plasminógeno en los pacientes sépticos fue significativamente menor ($p < 0,001$) que en el grupo control terapia y el grupo control normal, mientras no se encontraron diferencias significativas en la actividad de α_2 -antiplasmina entre los grupos estudiados (Tabla I.3.1). El descenso de los niveles de Plg en pacientes sépticos fue relatado también por otros autores ^{17,22}. La concentración plasmática de plasminógeno, al igual que otras proteínas, está determinada por el balance entre su síntesis y catabolismo, este último por degradación y/o consumo. El hecho que en los pacientes sépticos los niveles plasmáticos de APL sean normales indicaría por un lado, que el descenso en los niveles de Plg no está asociado a problemas de síntesis ya que ambas proteínas se sintetizan en el mismo sitio del hepatocito y por el otro, que la disminución de los niveles de plasminógeno no se debe a un aumento del consumo, ya que en ese caso también disminuye la APL por complejar a la plasmina generada.

De acuerdo a los datos de este estudio el descenso de los niveles plasmáticos del plasminógeno se debería principalmente a un aumento en la degradación del zimógeno. Los niveles plasmáticos de plasminógeno mostraron dos comportamientos diferentes entre los pacientes que sobrevivieron y los que no sobrevivieron, cuando se los estudió a través del tiempo. El nivel de plasminógeno en los pacientes sobrevivientes está normal o ligeramente disminuido al día 1 y aumenta hasta llegar a valores normales el día 7 (Fig. I.3.2). Existe diferencia significativa ($p < 0,001$) entre los niveles de plasminógeno en el día 1 y en el día 7 en los pacientes sobrevivientes. En cambio en los pacientes sépticos que no sobrevivieron, el plasminógeno esta

disminuido el primer día (Plg act 51 (15-75)%) y continúa disminuido hasta el día 7 en que concluyó el estudio. (Tabla I.3.2 y Fig. I.3.2).

Los niveles antigénicos de t-PA en el grupo séptico y en el grupo control terapia son mayores que en los controles sanos ($p < 0,001$); además, las concentraciones antigénicas de t-PA son 40% mayores en los pacientes sépticos que en los pacientes no sépticos de la misma unidad de terapia. El aumento de la actividad de t-PA en el GS y en el GCT podría deberse al estrés que sufren los pacientes internados en la unidad de terapia intensiva; el discreto aumento de t-PA en los pacientes sépticos podría deberse a una mayor activación de la célula endotelial. Los niveles antigénicos y de actividad de PAI- 1 están significativamente aumentados en ambos grupos de pacientes internados en terapia intensiva respecto al grupo de controles normales (Grupo Séptico vs. Grupo Normal $p < 0,001$; Grupo Control Terapia vs. Grupo Normal $p < 0,005$).

El aumento de PAI- 1 observado está de acuerdo a lo reportado por Dodderhoff, Salgado, Philippé y Llorente ^{212219,22}; este aumento reflejaría el comportamiento de reactante de fase aguda del PAI-1. En cuanto a los niveles de t-PAag, la bibliografía reporta datos controvertidos, ya que hay autores que encuentran niveles elevados de t-PAag ²²⁰ y otros describen niveles normales ^{2222,23}.

Para este grupo de pacientes sépticos, las determinaciones seriadas de t-PAag, PAIact y PAIag no muestran diferencias significativas entre sobrevivientes y no sobrevivientes (Tabla I.3.2).

Los datos expuestos muestran que los pacientes sépticos estudiados presentaron un estado hipofibrinolítico, debido principalmente a la disminución de los niveles plasmáticos del plasminógeno.

El incremento de los niveles de PAI-1 acentuaría aún más el estado hipofibrinolítico en estos pacientes.

La depresión del sistema fibrinolítico, junto con el estado de hipercoagulabilidad, ya señalado, contribuiría al desarrollo de la falla orgánica múltiple que se presenta frecuentemente en los pacientes sépticos.

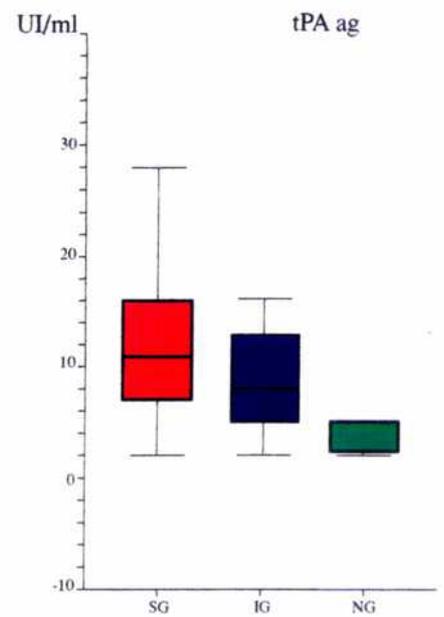
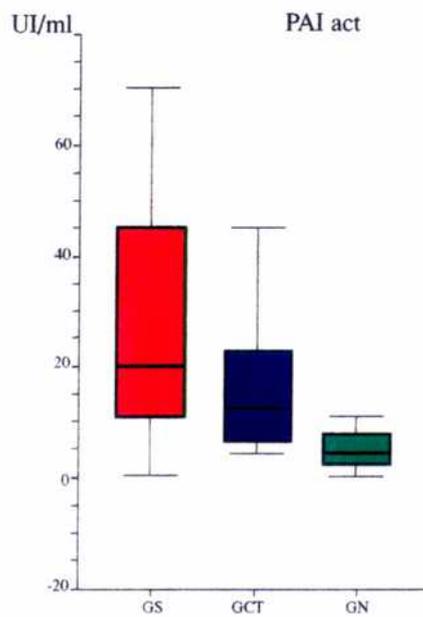
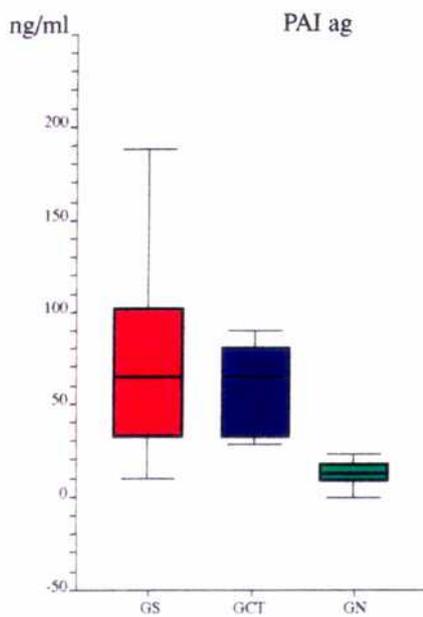
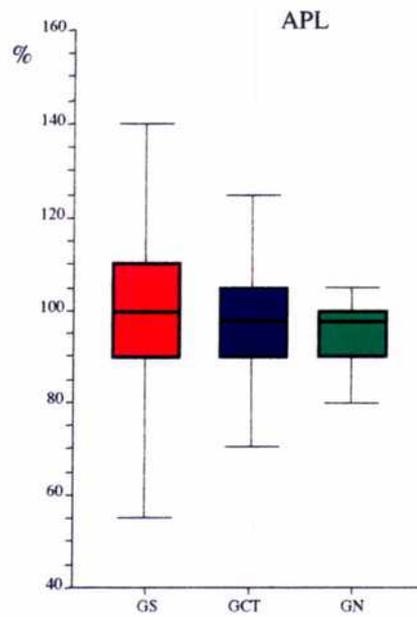
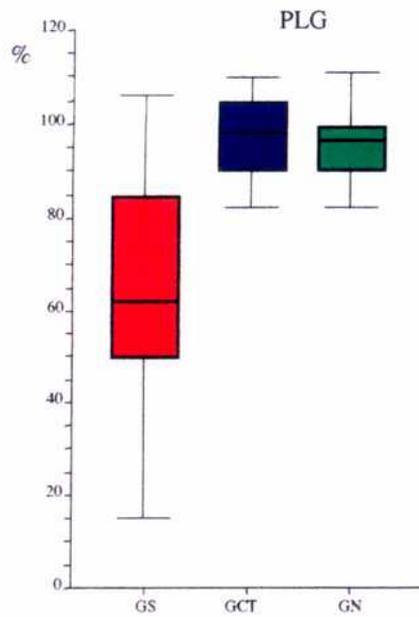


Fig. I. 3.1 - Análisis exploratorio de los componentes del Sistema Fibrinolítico (Múltiple Box and Whisker plot).

GS: Grupo Séptico.

GCT: Grupo Control Terapia.

GN: Grupo Normal.

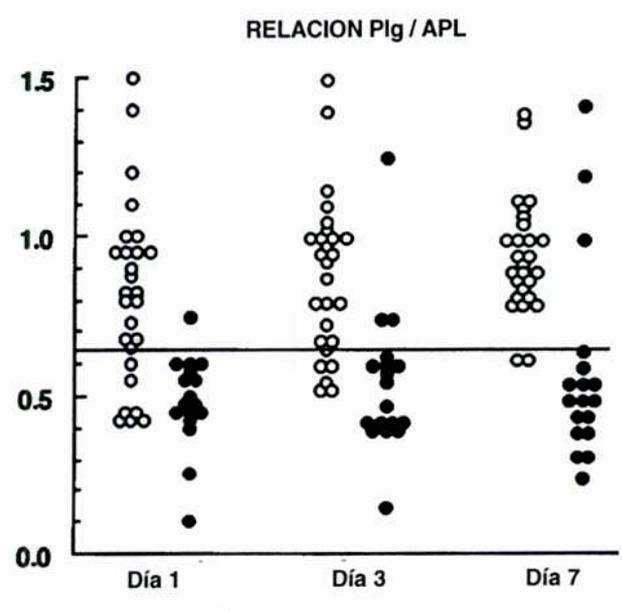
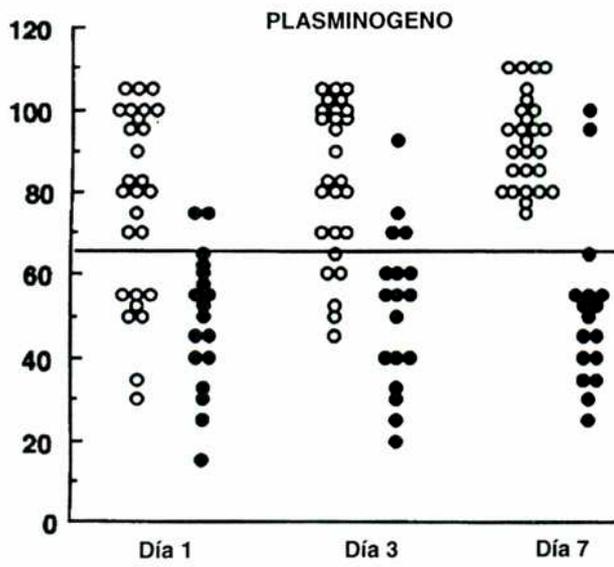


Fig. I. 3.2 - Niveles de Plasminógeno y de la relación Plg / APL los días 1, 3 y 7.

	Grupo Séptico (n=45)	Grupo Control Terapia (n=17)	Grupo Control Normal (n=30)
Plasminógeno %	65 (15-106)**	100 (82-108)	98 (75-110)
α_2 -antiplasmina %	100 (60-150)	98 (70-125)	97 (80-110)
Relación Plg/APL	0,6 (0,1-1,5)	1,0 (0,8-1,3)	10 (0,9-11)
t-PA (ng/ml)	11 (2-217)##	8 (3-16)##	2 (1-4)
PAI-1 act (UI/ml)	20 (1-240)##	10 (3-44)#	4 (0-10)
PAI-1 ag (ng/ml)	65 (10-210)##	68 (30-75)#	15 (0,6-46)

Tabla I.3.1: Parámetros del sistema fibrinolítico al día 1 en el Grupo Séptico, Grupo Control Terapia y Grupo Control Normal.

Los resultados son expresados como mediana y rango (entre paréntesis)

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$: diferencia significativa entre el Grupo Séptico y sendos Grupos Controles

$p < 0,005$: diferencia significativa entre el Grupo Control Terapia por un lado y el Grupo Control Normal por otro lado.

$p < 0,001$: diferencia significativa entre el Grupo Séptico y el Grupo Normal

	Pacientes	Día 1	Día 3	Día 7
Plasminógeno (%)	S	71 (30-106)	81 (60-106)#	92 (75-110)#
	NS	51 (15-75)	51 (15-75)	55 (25-100)
α_2 -antiplasmina (%)	S	100 (70-130)	100 (75-130)	100 (70-130)
	NS	99 (60-150)	98 (65-130)	100 (65-120)
Relación Plg/APL	S	0,83(0,42-0,15)*	0,80(0,85-0,11)*	0,90(0,50-0,14)*
	NS	0,47(0,11-0,75)*	0,50(0,20-0,11)*	0,50(0,25-0,11)*
t-PA (ng/ml)	S	10 (2-80)	10 (2-70)	9 (2-25)
	NS	14 (4-217)	13 (4-63)	10 (4-58)
PAI-1 (ng/ml)	S	65 (13-210)	55 (10-300)	44 (13-250)
	NS	70 (10-180)	74 (10-310)	80 (20-300)
PAI-1 act (UI/ml)	S	20 (1-240)	20 (1-190)	18 (0-170)
	NS	20 (2-120)	21 (2-130)	27 (2-120)

Tabla I.3.2: Parámetros del sistema fibrinolítico en pacientes sépticos. Comparación entre sobrevivientes (S) (n=27) y no sobrevivientes (NS) (n=18).

Los resultados son expresados en mediana y rango.* $p < 0,001$ diferencia significativa entre sobrevivientes y no sobrevivientes.# $p < 0,001$ comparando con el día 1.

I.4- OTRAS DETERMINACIONES

El complejo elastasa - α_1 -inhibidor de proteinasa (EAPI) se determinó en los tres grupos de pacientes, mostrando que el complejo EAPI está significativamente elevado ($p < 0,001$) en los pacientes sépticos respecto a los otros dos grupos controles (Grupo séptico: EAPI 320 (210-515)mg/ml; Grupo Control Terapia 78 (62- 100); Grupo Control Normal 80 (61-102))

Este hecho, ya reportado en la bibliografía por Seitz ^{216,217} y mostrado por varios autores ^{212,215,221} confirmaría que los pacientes tienen una activación neutrófila, con liberación del contenido de sus gránulos. El EAPI no correlaciona con ninguno de los otros parámetros estudiados al día 1. La determinación de EAPI seriada no se realizó por el alto costo de los reactivos y porque numerosos estudios previos han demostrado que el complejo no es un buen marcador pronóstico en pacientes sépticos, ya que en presencia de cualquier infección los niveles de EAPI se incrementan rápidamente.

El factor de necrosis tumoral (TNF) señalado inicialmente como uno de los mediadores de la cascada séptica se determinó en 30 de los 45 pacientes sépticos, encontrándose elevados en todo este grupo de pacientes (GS: 10.9 (0.4-46); GCT: 0.6 (0-0.7) y GN: no detectable) pero no muestran diferencias significativas entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes. Tampoco existe correlación entre los niveles de TNF y las infecciones Gram negativas, hecho que concuerda con lo descrito por otros autores ²²⁴. Dodderhoff et al ²¹⁹ no hallaron diferencias significativas, en los niveles de TNF, entre sobrevivientes y no sobrevivientes cuando estudiaron un grupo de 20 pacientes sépticos. Philippé ²²⁰ demostró que cuando el TNF se evalúa junto a otras variables no alcanza significación estadística, como marcadores predictivos de sobrevida en sepsis.

El dermatán sulfato (DS), un glicosaminoglicano sintetizado por los fibroblastos y potenciador de la inhibición de trombina por el cofactor II de la heparina, no está presente normalmente en el plasma. 40 de los 45 de los pacientes sépticos mostraron niveles plasmáticos de DS significativamente elevados; la presencia de DS en plasma podría deberse a la injuria endotelial que existe en estos pacientes. (Grupo Séptico: DS(mg/ml) 1.9(0,004-3.4); Grupo Control Terapia 0,004 (0,00-0,006) y Grupo Control Normal: no detectable). En la bibliografía no existen datos acerca de los niveles de dermatán sulfato en sepsis y sería necesario un estudio de mayor cuantía para establecer si el DS correlaciona con otros marcadores de activación endotelial (IL-6, IL-10).

I.5- ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS DE SOBREVIDA EN SEPSIS POR REGRESION LOGISTICA

Debido a la complejidad de los diversos mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria sistémica a sido difícil de establecer marcadores predictivos de sobrevida del proceso séptico. Durante muchos años se ha estudiado si cambios en las concentraciones plasmáticas de los componentes del sistema de coagulación o fibrinolítico, o en los niveles plasmáticos de diversas citoquinas (TNF, IL-6) o en los niveles plasmáticos del marcador de degranulación neutrófila (EAPI) podrían predecir la sobrevida²¹⁵⁻²²⁴.

Cuando se realizó el estudio de la probabilidad de sobrevida en función de aquellas variables hemostáticas (antitrombina III, plasminógeno y proteína C) que diferían significativamente al día 1 entre los pacientes que sobrevivieron y no sobrevivieron, se encontró por regresión logística que la probabilidad de sobrevida (S) depende de la variable plasminógeno (Plg) según el siguiente modelo final:

Modelo final	Error standard	$\chi^2 +$ est
Log S=-3.638 + 2,944(Plg)	0,86	28.8

p<0,00001

Resultados similares se encontraron para los días 3 y 7.

Así, la probabilidad de sobrevida del paciente puede expresarse en función de los niveles de actividad plasmática del plasminógeno.

El nivel de Plg en el plasma de cada uno de los pacientes sobrevivientes estuvo normal o ligeramente disminuido al día 1 y aumentó hasta llegar a valores normales el día 7 (en todos los pacientes). En cambio en los pacientes sépticos que no sobrevivieron, los niveles de Plg están ligeramente o muy disminuidos en el primer día (Plg act 51 (15-75)%) y disminuyen más o se mantienen bajos al día 7, en que concluyó el estudio (Fig. I.3.2).

Como ya se mencionó, los niveles de Plg están determinados por el balance entre su síntesis y catabolismo, por lo tanto sería útil poder expresar la probabilidad de sobrevida no en función de los niveles de Plg sino de relación de la Plg/APL, ya que de esta forma se elimina la variabilidad respecto a los problemas de síntesis que pueden ocurrir en los pacientes con daño hepático (ver I.3).

Por consideraciones clínicas, se realizó nuevamente el estudio de la probabilidad de sobrevida (S) incluyendo la relación (Re=Plg/APL) como variable explicativa.

Se obtuvo, así, el siguiente modelo final.

Modelo final	Error standard	$\chi^2 +$ est
Log S= -4.234 + 7,407(Re)	2.30	20,35

p< 0.00001

Se calcularon, la sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte con incrementos de 5% para Plg y de 0.05 para la Re. Se obtuvo así que, el mejor punto

de corte para el Plg era 65% y para Re resultó 0.65. La tabla I.5.1 muestra la sensibilidad y especificidad para cada variable.

Marcador	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad
Plg	65%	90.5%	66.7%
Plg/APL	0.65	95.2%	70.8%

Tabla I.5.1. Sensibilidad y especificidad de los marcadores y puntos de corte elegido en el día 1. Sensibilidad y especificidad similares se obtienen con datos del día 3 y día 7 para el mismo punto de corte.

La Fig. I.5.1. muestra la curva ROC para las dos variables de ajuste Re y Plg; se puede observar que no hay una clara diferenciación entre ambos ajustes y si bien la relación Plg/APL tiene una sensibilidad ligeramente superior y mayor especificidad, la cantidad de pacientes estudiados no es suficiente para decidir si el cociente Plg/APL o el Plg solo es el mejor marcador, pero desde el punto de vista clínico la relación Plg/APL sería de mayor utilidad.

En estudios previos se han sugerido distintos marcadores para predecir el desenlace del episodio séptico, tales como la relación antitrombina III - PAI antigénico²²³; los niveles antigénicos de los activadores del plasminógeno tisular y tipo uroquinasa²²⁰; la concentración plasmática de factor de necrosis tumoral y los niveles de PAI-1¹⁵⁸.

En este estudio no se han encontrado diferencias significativas en los niveles antigénicos de t-PA, factor de necrosis tumoral y PAI-1 entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes

Ensayos electrozímográficos en el plasma de los pacientes sépticos, mostraron aumento de la actividad del activador tipo uroquinasa (u-PA) en sólo 3 pacientes, por lo que no se dosaron cuantitativamente los niveles antigénicos de u-PA.

Si bien la ATIII y la PC mostraron diferencias significativas entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes, el estudio por regresión logística reveló que al establecer la probabilidad de sobrevida estas variables no intervienen.

La diversidad de los marcadores señalados en los distintos estudios refleja lo difícil que es encontrar un marcador plasmático que represente el conjunto de interrelaciones que existen entre los distintos sistemas plasmáticos y celulares que están involucrados en el curso del proceso séptico y que varían de acuerdo a la terapéutica aplicada. Las diferencias en los hallazgos al estudiar los distintos grupos de pacientes sugiere la necesidad de realizar un estudio multicéntrico con mayor número de pacientes y un protocolo bien establecido.

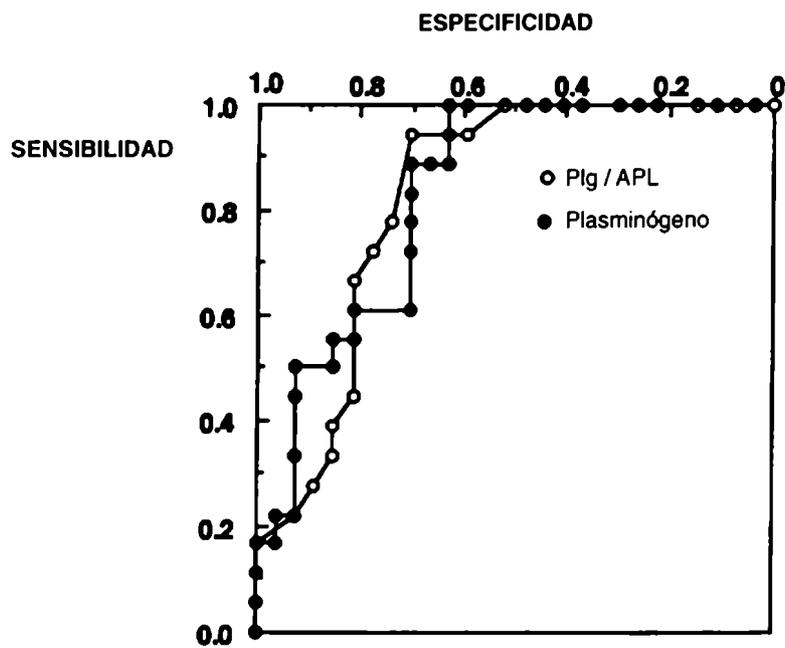


Fig. I. 5.1 - Curva ROC para las variables Plg / APL y Plasminógeno.

I.6- CONCLUSIONES

El paciente séptico presenta una respuesta inflamatoria sistémica a la infección, con daño endotelial y una gran variedad de manifestaciones clínicas (fiebre, leucocitosis, taquicardia, etc.). La activación endotelial producida origina un desequilibrio en el balance hemostático ^{213,217}.

Los pacientes sépticos estudiados muestran un estado hipercoagulable e hipofibrinolítico que podría conducir a una microtrombosis capilar, causa de la falla orgánica múltiple, que suelen presentar estos pacientes. Los resultados hallados en este estudio son similares a los descritos en otros trabajos realizados en EE.UU y Europa ^{228,225}.

El estado hipercoagulable está dado por los altos niveles plasmáticos de fibrinógeno y por los niveles disminuidos de los inhibidores fisiológicos, principalmente antitrombina III, proteína C y cofactor II de la heparina.

Los altos niveles del complejo TAT presente en estos pacientes confirman la activación del sistema de coagulación.

Los plasmas de los pacientes sépticos presentaron altos niveles del complejo EAPI (elastasa - α_1 -antitripsina), lo cual demuestra la activación de los granulocitos, ya descrita por otros autores en pacientes sépticos ^{215,217}.

Los pacientes sépticos tuvieron altos niveles de TNF, reflejando la injuria endotelial existente en esta patología. Los niveles de TNF no mostraron diferencias significativas entre los pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes, como lo señala Philippé en un estudio previo ²²¹.

El daño endotelial estaría reflejado por los altos niveles de dermatán sulfato (DS) en el plasma de los pacientes sépticos (en la bibliografía no existen datos al respecto).

La hipofibrinólisis es el resultado principalmente del descenso de los niveles plasmáticos de plasminógeno (Plg) y de los altos valores de PAI-1.

Los pacientes sépticos también mostraron niveles plasmáticos de t-PA elevados, pero no serían sólo consecuencia de la sepsis sino también producto del estrés

producido por su estadía en la unidad de terapia intensiva. Los pacientes estudiados mostraron, por electrozimografía, niveles normales de activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

La actividad de α_2 -antiplasmina fue normal en los pacientes sépticos, acorde con lo reportado por otros autores^{220,222}.

Distintos estudios in vitro demuestran que la α_2 -antiplasmina es degradada por la elastasa leucocitaria; por lo que la presencia de valores normales en los pacientes sépticos probablemente se deba a que su síntesis esté aumentada por ser un reactante de fase aguda, compensando así la inactivación por la enzima leucocitaria.

Los estudios por regresión logística han demostrado que la probabilidad de Sda del paciente puede describirse como función de los niveles de plasminógeno o de la relación plasminógeno/ α_2 -antiplasmina.

Los datos expuestos permiten señalar que los niveles de Plg o la relación Plg/APL son útiles para monitorear la eficacia de la terapéutica aplicada, ya que si el paciente mantiene sus niveles de plasminógeno en valores menores de 65% aumenta su probabilidad de muerte.

II- DEGRADACION DEL PLASMINOGENO: MINIPLASMINOGENO

El estudio del sistema hemostático ha demostrado que los pacientes sépticos tienen un estado hipercoagulable e hipofibrinolítico; este último debido, fundamentalmente, a un descenso en los niveles de plasminógeno. La disminución de la concentración plasmática de una proteína se debe a un desbalance entre su velocidad de síntesis y su velocidad catabólica, esta última por degradación o consumo. La síntesis del plasminógeno, al igual que la de α_2 -antiplasmina, se produce fundamentalmente en el hepatocito por lo tanto es poco probable que el descenso del Plg se deba a una alteración de la síntesis, por daño hepático, ya que en los pacientes sépticos los niveles de α_2 -antiplasmina son normales. La disminución del Plg tampoco podría deberse a una hiperfibrinólisis ya que esto conduciría a una disminución simultánea de los niveles de α_2 antiplasmina por consumo del inhibidor. Por lo tanto, los niveles de plasminógeno estarían disminuidos por un aumento de la degradación de esta proteína.

Kordich et al ²⁷ han demostrado que algunos plasmas de pacientes sépticos presentan una fracción proteica que no se une a lisina-sefarosa, tiene actividad plasmínica y actividad inmunológica frente al antisuero policlonal antiplasminógeno humano. Es decir que dicho fragmento podría ser miniplasminógeno, también obtenido por acción de la elastasa leucocitaria en ensayos in vitro ¹⁹⁹.

Las experiencias que se muestran a continuación pretenden esclarecer si la elastasa leucocitaria y los polimorfonucleares degranulados clivan in vitro al plasminógeno generando miniplasminógeno y si esta molécula está presente en el plasma de los pacientes sépticos.

II.1- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE PLASMINOGENO HUMANO

A partir de un pool de plasmas normales se obtuvo plasminógeno nativo (Glu-Plg) por cromatografía de afinidad sobre lisina-sefarosa en presencia de la aprotinina.

La fig. II.1.1 muestra el perfil de elución del plasminógeno a través de la columna de lisina-sefarosa. El tubo Nro 2, cuya absorbancia a 280 nm fue de 0,8 presenta actividad plasmínica frente al sustrato cromogénico H-D-Val-Leu-Lys-pNA y reacción inmunológica positiva frente a un anticuerpo policlonal antiplasminógeno humano por la técnica de Outcherlony y por SDS-PAGE/ Western blot.

La electroforesis de la solución presente en el tubo 2 sobre geles de poliacrilamida con SDS, muestra una banda mayoritaria correspondiente a 83 ± 2 kD (El peso molecular es el promedio de tres electroforesis). El valor del peso molecular hallado concuerda con la bibliografía ya que si bien el peso molecular determinado por secuenciación aminoacídica es 92 kD²² el peso molecular determinado por SDS-PAGE es 85 kD¹⁹⁹. La Fig. II.1.2 muestra el análisis del plasminógeno por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida y el gradiente de pH obtenido. Puede observarse que el gradiente presenta poca pendiente, lo cual permite una mayor resolución en las distintas mediciones de los puntos isoelectrónicos. Una vez estandarizada la técnica se realizaron tres isoelectroenfoces, con la misma relación volts/horas del tubo Nro. 2, para determinar los puntos isoelectrónicos, de las variantes isofórmicas del plasminógeno.

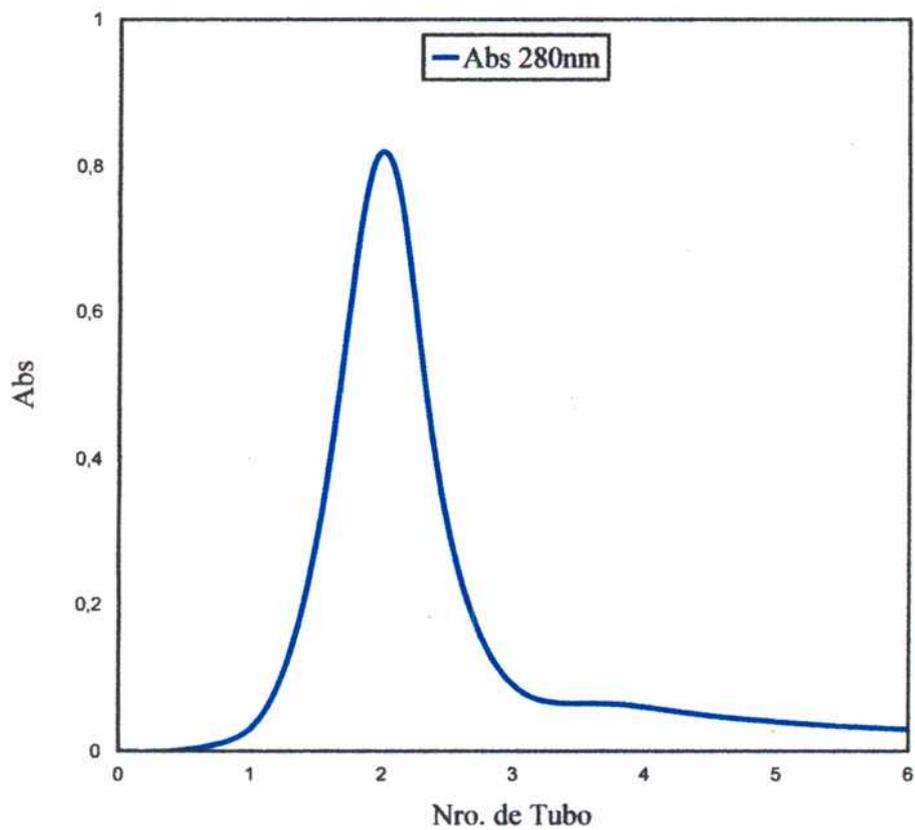


Fig. II.1.1- Perfil de elución del plasminógeno de la columna de lisina-sefarosa. La cromatografía de afinidad se realizó según lo descrito en Sección II.1.1 de Materiales y Métodos. El tubo Nro. 2 presentó actividad plasmínica y reacción inmunológica positiva frente al anticuerpo policlonal antiplasminógeno humano.

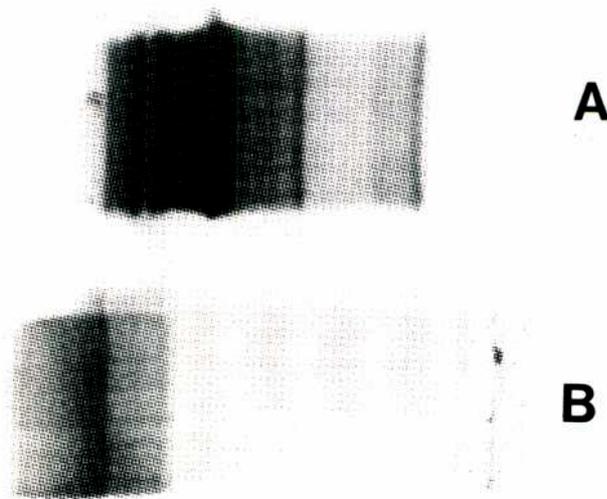
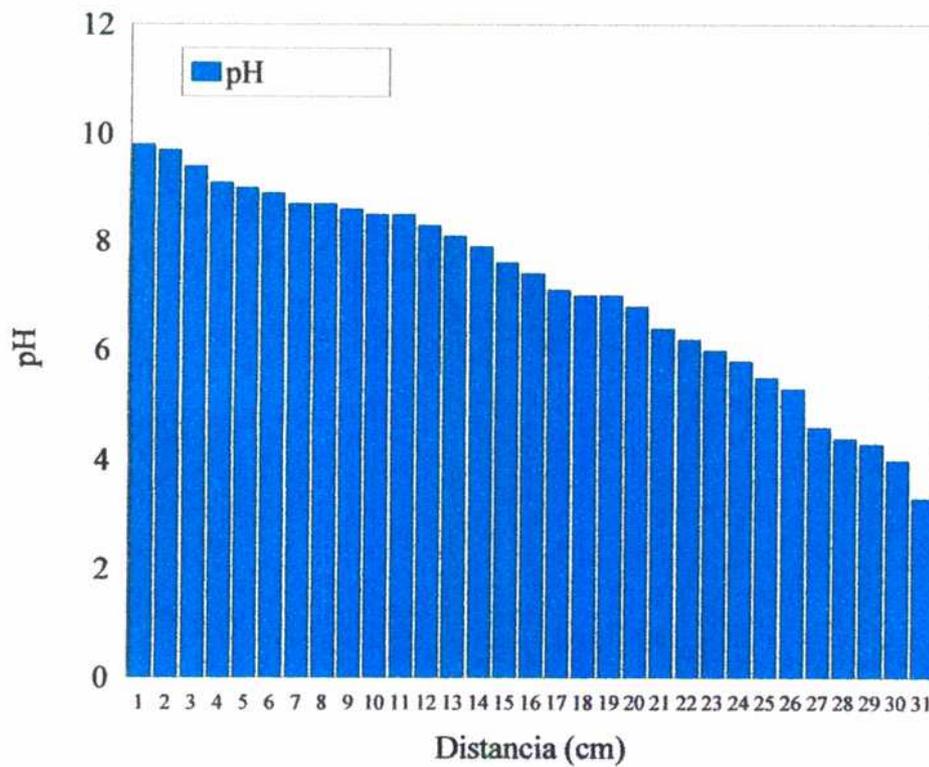


Fig. II.1.2. Isoelectroenfoco de plasminógeno (A) y del miniplasminógeno (B)
 Se aplicaron 3500 volts horas a una placa de poliacrilamida T: 5%
 Masa sembrada: 10 μ g Tinción: Azul Brillante de Coomassie.
 El gradiente de pH se determinó eluyendo los iones H⁺ del gel según lo descrito en
 Materiales y Métodos. Punto isoelectrico del Plasminógeno: pH 7,6 a 8,8 (variantes más
 abundantes pH 7, 9; 8,2 y 8,3). Punto isoelectrico del miniplasminógeno: pH 8,5

II.2. DEGRADACION DEL PLASMINOGENO POR ACCION DE ELASTASA LEUCOCITARIA PURA OBTENCION DE MINIPLASMINOGENO

Se incubó a 37°C plasminógeno humano con elastasa leucocitaria humana en distintas proporciones (2,2 μ M:1UI/ml; 1,1 μ M/10 UI/ml) y se tomaron alícuotas a las 2, 4 y a las 24 horas. Para observar si el efecto proteolítico desaparecía por agregado de α_1 -inhibidor de proteinasa se incubó un tubo conteniendo este inhibidor en exceso, elastasa y plasminógeno. Se frenó la reacción y con cada alícuota se realizó una electroforesis SDS-PAGE seguida por una electrodifusión a membrana de nitrocelulosa (Western blot) y revelado con un antisuero monoclonal altamente selectivo para el K5 del plasminógeno.

Se puede observar (Fig. II.2 , relación: 1,1 μ M: 1UI/ml.) que a las 2 horas aparece una banda alrededor de 40 kD que corresponde a fragmentos que contienen al K5, previos a la formación de miniplasminógeno; a este tiempo todavía existe plasminógeno sin degradar (banda alrededor de 85kD). A las 4 horas de comenzada la incubación, aparece una banda de 38 kD que presenta el K5 (calle 4) y desaparece completamente la banda del plasminógeno. Cuando se extrajo una muestra a las 3 horas se observó la presencia de Plg intacto (datos no mostrados). La calle 2 correspondiente a la incubación de 24 hs. del Plg con elastasa leucocitaria en presencia de α_1 PI en exceso muestra al Plg intacto lo que indica que el α_1 -inhibidor de proteinasa inhibe eficientemente la acción proteolítica de la elastasa sobre el Plg. La incubación de 24 hs. no presenta ninguna banda, lo cual indicaría que la acción prolongada de la elastasa leucocitaria genera fragmentos pequeños que pierden los epitopes que reconoce el antisuero utilizado. Estos resultados son similares a los descritos por Moroz y Leitz ¹⁹⁹. El mismo perfil electroforético se observa cuando se realizó el SDS-PAGE/Western blot de las mezclas de incubación 2,2 μ M/1 UI/ml y 1,1 μ M/10 UI/ml.

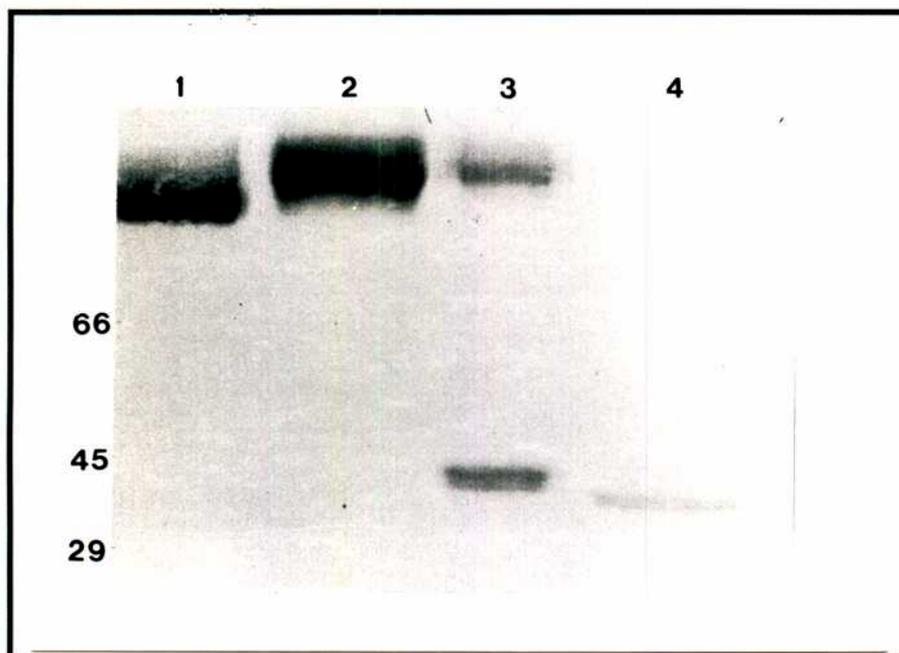


Fig. II.2. Acción de la elastasa leucocitaria humana sobre el plasminógeno

La técnica de SDS-PAGE/Western blot se realizó según Materiales y Métodos y se reveló con antisuero monoclonal altamente selectivo para el K5 del plasminógeno.

1. Plasminógeno humano purificado.
2. Incubación de plasminógeno humano con elastasa leucocitaria (1,1 μ M: 1UI/ml) durante 24 horas en presencia de α_1 -inhibidor de proteinasa.
3. Plasminógeno humano incubado 2 horas con elastasa leucocitaria.
4. Plasminógeno humano incubado 4 horas con elastasa leucocitaria.

II.2.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MINIPLASMINOGENO

El plasminógeno humano purificado fue incubado con elastasa leucocitaria humana durante 4 horas a 37°C (este es el tiempo óptimo de incubación establecido en los ensayos previos). La mezcla resultante se filtró a través de una columna de afinidad lisina-sefarosa y el filtrado se dializó durante 24 horas. Se concentró y se obtuvo así una solución proteica 1,1 μ M con la cual se realiza una electroforesis SDS-PAGE, que muestra una sola banda mayoritaria alrededor de los 38 kD (el peso molecular se determina utilizando marcadores de peso molecular según lo descrito en Materiales y Métodos).

La fig. II.2 muestra el resultado de la corrida por SDS-PAGE (Calle 4), seguido de una electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa revelada con un antisuero monoclonal altamente selectivo para miniplasminógeno (reconoce solo la región del K5 del plasminógeno).

Cuando la solución proteica se incubó con uroquinasa se generó actividad amidolítica sobre H-D-Val-Leu-Lys-pNA, un sustrato específico de plasmina.

De los resultados expuestos se concluye que el fragmento aislado es miniplasminógeno, fragmento ya descrito por Sottrup-Jensen et al ¹⁸ y aislado por Moroz ¹⁹⁹ a partir de elastasa leucocitaria y plasminógeno humano.

Con el miniplasminógeno se realizó un isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. La fig. II.1.2. muestra el gradiente de pH formado y la aparición de una banda mayoritaria que presenta un punto isoeléctrico de 8.5. No hay bibliografía respecto al punto isoeléctrico del miniplasminógeno, pero el valor obtenido concuerda con el hecho que en una electroforesis sobre acetato de celulosa pH 8,6 el miniplasminógeno aparece en la zona de las gamaglobulinas séricas.

El miniplasminógeno obtenido se utilizó para realizar los ensayos de actividad (parte III.3).

II.3- DEGRADACION DEL PLASMINOGENO POR EL EXTRACTO DE ENZIMAS LEUCOCITARIAS

Los gránulos azurófilos, presentes en el citoplasma de los polimorfonucleares, tienen tres proteasas neutras, elastasa, catepsina G y proteinasa 3, entre otras enzimas. Con el fin de comparar el grado de proteólisis producido por el extracto leucocitario respecto del generado por la elastasa leucocitaria, se incubaron distintas concentraciones de plasminógeno con extracto de enzimas leucocitarias.

El extracto leucocitario se obtuvo por el método de Travis a partir de sangre enriquecida en las formas inmaduras de la serie granulocítica neutrófila. En el extracto obtenido se determinó la actividad estearásica de la elastasa frente al sustrato cromogénico S-2284, como un índice de actividad enzimática. Para hacer los ensayos con el plasminógeno se concentró el extracto leucocitario hasta obtener una actividad enzimática de 1 UI/ml.

Se incubaron a 37°C distintos volúmenes de plasminógeno 1,1 μ M (concentración plasmática) y extracto leucocitario (actividad de elastasa 1 UI/ml): 10:1(vol/vol) ; 20:1 y 5:1. Se tomaron alícuotas a las 2, 4 y 24 horas de iniciada la incubación; estas fracciones fueron estudiadas por SDS-PAGE/Western blot y reveladas con un antisuero policlonal antiplasminógeno humano (calles 4 y 5) y un antisuero monoclonal anti K5 del plasminógeno (calles 1, 2 y 3) (el K5 es el único kringle que está presente en el miniplasminógeno por lo que el antisuero es altamente selectivo para miniplasminógeno).

La Fig. II.3 muestra la acción proteolítica del extracto de enzimas leucocitarias cuando la incubación se realizó en la proporción plasminógeno /enzima 10:1 (vol/vol) A las 2 horas (calle 2) se observa la aparición de una banda de alrededor de 40 kD y una banda de aproximadamente 85 kD que corresponde al plasminógeno intacto. A las 4 horas el plasminógeno ha sido completamente degradado y aparece

una banda de peso molecular alrededor de 38 kD que corresponde al miniplasminógeno, cuando se revela con el antisuero monoclonal (calle 3).

Cuando se revela con el antisuero policlonal antiplasminógeno humano, que reconoce todos los fragmentos del plasminógeno, en la calle 4 se observan tres bandas entre 40 kD y 25 kD que corresponderían a los distintos fragmentos del plasminógeno, angiostatina (K123), K4 y miniplasminógeno. La alícuota correspondiente a 24 horas de incubación no presentó ninguna banda, lo cual indicaría que la acción proteolítica no termina en el miniplasminógeno, sino que continúa a una degradación mayor que da origen a fragmentos menores no reconocibles por los anticuerpos utilizados (datos no mostrados). El sobrenadante correspondiente a 24 hs. de incubación no presentó actividad plasmínica.

Cuando la incubación del plasminógeno y el extracto leucocitario se realiza en presencia de un exceso de α_1 -inhibidor de proteinasa la electrodifusión a membrana de nitrocelulosa posterior a la electroforesis muestra una banda correspondiente al plasminógeno humano purificado intacto. Estos resultados indican que α_1 -inhibidor de proteinasa es capaz de inhibir todas las proteasas presentes en el extracto leucocitario.

Las alícuotas provenientes de las otras incubaciones presentaron el mismo perfil electroforético; la velocidad de degradación del plasminógeno es dependiente de la concentración de enzima, es decir que a mayor concentración de enzima menor es el tiempo que tarda en desaparecer la banda de plasminógeno intacto. Con altas concentraciones de extracto leucocitario a las 12 hs de incubación la electrodifusión a membrana de nitrocelulosa no muestra ninguna banda, lo cual indicaría que la proteólisis del Plg no es limitada, sino que en presencia de un exceso de proteasas continúa a fragmentos pequeños, sin actividad plasmínica y no reconocibles por los antisueros antiplasminógeno.



Fig. II.3 Acción del extracto leucocitario sobre el plasminógeno humano.

SDS-PAGE/Western blot se realiza según Materiales y Métodos, utilizando antisuero monoclonal altamente selectivo para el K5 del plasminógeno (calles 1,2,3) y un antisuero policlonal antiplasminógeno humano (calles 4 y 5). Los números indican el peso molecular de los marcadores utilizados.

1. Plasminógeno humano.
2. Plasminógeno humano incubado 2 horas con extracto leucocitario.
3. Plasminógeno humano incubado 4 horas con extracto leucocitario.
4. Plasminógeno humano incubado 4 horas con extracto leucocitario.
5. Plasminógeno humano.

II.4- PROTEOLISIS DEL PLASMINOGENO, IN VITRO, POR POLIMORFONUCLEARES DEGRANULADOS

Se aislaron polimorfonucleares a partir de sangre humana total por el método de Boyum. En todos los aislamientos realizados se obtuvo una viabilidad promedio del 90% y el frotis, teñido por May Grunwald Giemsa muestra, un 98% de células granulocíticas. Dos volúmenes de $1,5 \times 10^8$ cel/ml se preincubaron con citocalasina B y se incubaron con un volumen de:

- i) Plg 1 mg/ml (ensayo A)
- ii) Plg 0,2 mg/ml (concentración plasmática) (ensayo B)
- iii) plasma humano normal (ensayo C)
- iv) plasminógeno (1mg/ml) y α_1 -inhibidor de proteasas (6 mg/ml) (ensayo D).

Se realiza un tubo control conteniendo 10^8 cel/ml y Plg (1 mg/ml) donde no se induce la degranulación para comprobar que el plasminógeno no se adhiere a los polimorfonucleares.

Las mezclas preincubadas se estimularon con FMLP y se dejaron a 37°C durante 15 horas hasta frenar la reacción con PMSF.

El porcentaje de degranulación de los gránulos azurófilos medidos por actividad de elastasa fue de 52% y medido por actividad de mieloperoxidasa de 55%.

En el tubo que contenía el inhibidor no pudo establecerse el porcentaje de degranulación pero se asumió que era el mismo que en el resto de los tubos.

El plasminógeno y sus fragmentos se investigaron por SDS-PAGE/Western blot utilizando un anticuerpo policlonal antiplasminógeno humano. La electrodifusión a membrana de nitrocelulosa del ensayo A (Fig. II.4 calle 2 y 5) muestra tres bandas entre 45 y 30 kD, similar a los fragmentos obtenidos por proteólisis in vitro con elastasa. Los ensayos B y C no presentan banda correspondiente al Plg intacto ni a los fragmentos proteolíticos (Fig. II.4 calle 3 y 4). Cuando se utiliza una

concentración de Plg purificado igual a la plasmática (Ensayo B) la electrodifusión a membrana de nitrocelulosa no muestra ninguna banda (Fig. II.4, calle 4).

Este hecho indicaría que el Plg, a la concentración plasmática, es degradado a fragmentos pequeños cuando hay una degranulación de polimorfonucleares.

La ausencia de bandas en el ensayo B (Fig. II.4, calle 3) donde la degranulación se realizó en presencia de plasma humano, indicaría que a la concentración plasmática, el α_1 -inhibidor de proteinasas no es capaz de inhibir la acción de las proteasas neutrófilas, cuando la degranulación es masiva; esta situación reflejaría en parte lo que ocurre cuando se produce una activación de los polimorfonucleares en sitios de inflamación a nivel extravascular.

El Western blot del ensayo D muestra una sola banda de 83 kD, correspondiente al plasminógeno intacto, demostrando que un exceso de α_1 -inhibidor de proteinasa inhibe completamente la acción proteolítica de las enzimas liberadas.

Estos ensayos muestran que cuando los polimorfonucleares se degranulan, las enzimas liberadas degradan parcial o totalmente al plasminógeno dependiendo de la concentración de zimógeno. El proceso proteolítico no es inhibido por el α_1 -inhibidor de proteinasa a la concentración plasmática, pero sí por un exceso de inhibidor en las condiciones del ensayo.

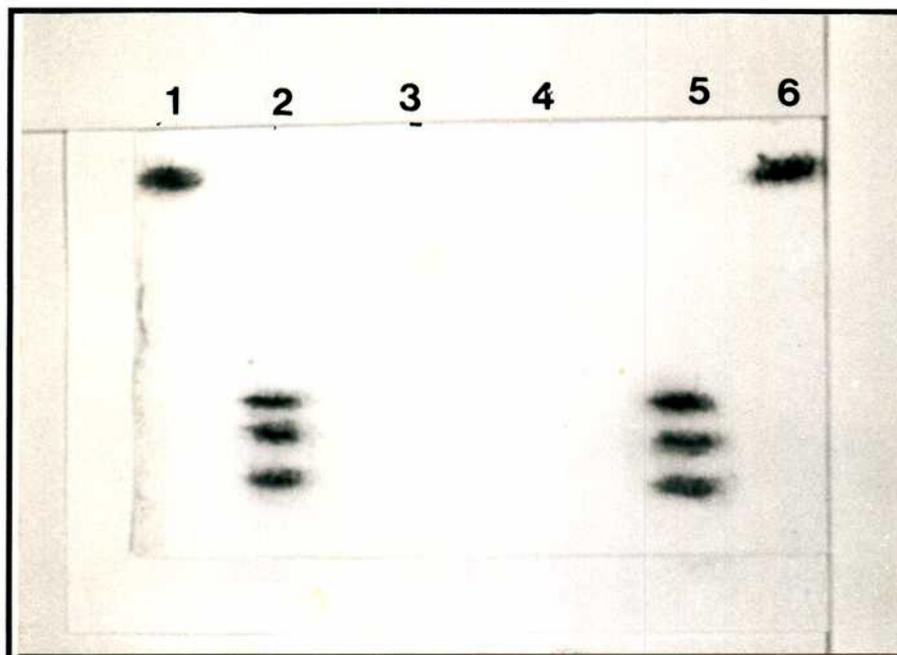


Fig. II.4. Proteólisis del plasminógeno por acción de polimorfos nucleares degranulados. SDS-PAGE/Western blot se realizó según Materiales y Métodos revelando con antisuero policlonal antiplasminógeno humano.

1. Sobrenadante de la incubación de plasminógeno humano con PMN sin degranular.
2. Sobrenadante de la incubación de plasminógeno humano (1mg/ml) con PMN degranulados.
(Ensayo A)
3. Sobrenadante de la incubación de plasma humano con PMN degranulados.(Ensayo C)
4. Sobrenadante de la incubación de plasminógeno humano (0,2mg/ml) con PMN degranulados.
(Ensayo B)
5. Sobrenadante de la incubación de plasminógeno humano (1mg/ml) con PMN degranulados.
(Ensayo A)
6. Sobrenadante de la incubación de plasminógeno humano con PMN degranulados en presencia de α_1 -inhibidor de proteinasa en exceso. (Ensayo D)

Todas las alícuotas fueron extraídas a las 15 horas de incubación.

II.5- INVESTIGACION DE LA PRESENCIA DEL MINIPLASMINOGENO EN EL PLASMA DE PACIENTES SEPTICOS

Dado que los resultados ya expuestos mostraban que la elastasa, el extracto leucocitario y los polimorfonucleares activados tienen acción proteolítica in vitro sobre el plasminógeno, se trató de investigar si esa degradación ocurriría in vivo.

Con ese fin los plasmas de 24 pacientes sépticos fueron filtrados a través de una columna de lisina-sefarosa. Los filtrados recogidos fueron concentrados y se investigó en ellos la presencia de miniplasminógeno por SDS-PAGE/Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el K5 del plasminógeno y un anticuerpo policlonal antiplasminógeno humano. Ocho de los veinticuatro plasmas filtrados (33%) tuvieron el perfil que muestra la Fig.II.5 (calles A, B, C y F). B y C muestran una banda de 38 kD correspondiente al miniplasminógeno, en cambio A muestra una banda de 38 kD y otra más importante alrededor de los 40 kD, similar a la que se obtenía en la degradación parcial del Plg in vitro.

En la calle F de la Fig. II.5 B, donde se revela con antisuero policlonal, se observan tres bandas entre 40 y 30 kD, similares a las obtenidas por acción del extracto leucocitario in vitro (Fig. II.3.calle 3).

El hecho que se haya detectado fragmentos del miniplasminógeno en sólo el 33% de los pacientes podría deberse a que esta molécula pequeña y polar se depura rápidamente in vivo por lo cual no se la puede detectar en el plasma o bien, que la acción proteolítica fuese de una intensidad y continuidad tal que genere fragmentos proteolíticos no reconocibles con los antisueros utilizados (situación similar ocurre in vitro, cuando se deja que las enzimas actúen por más de 12 horas).

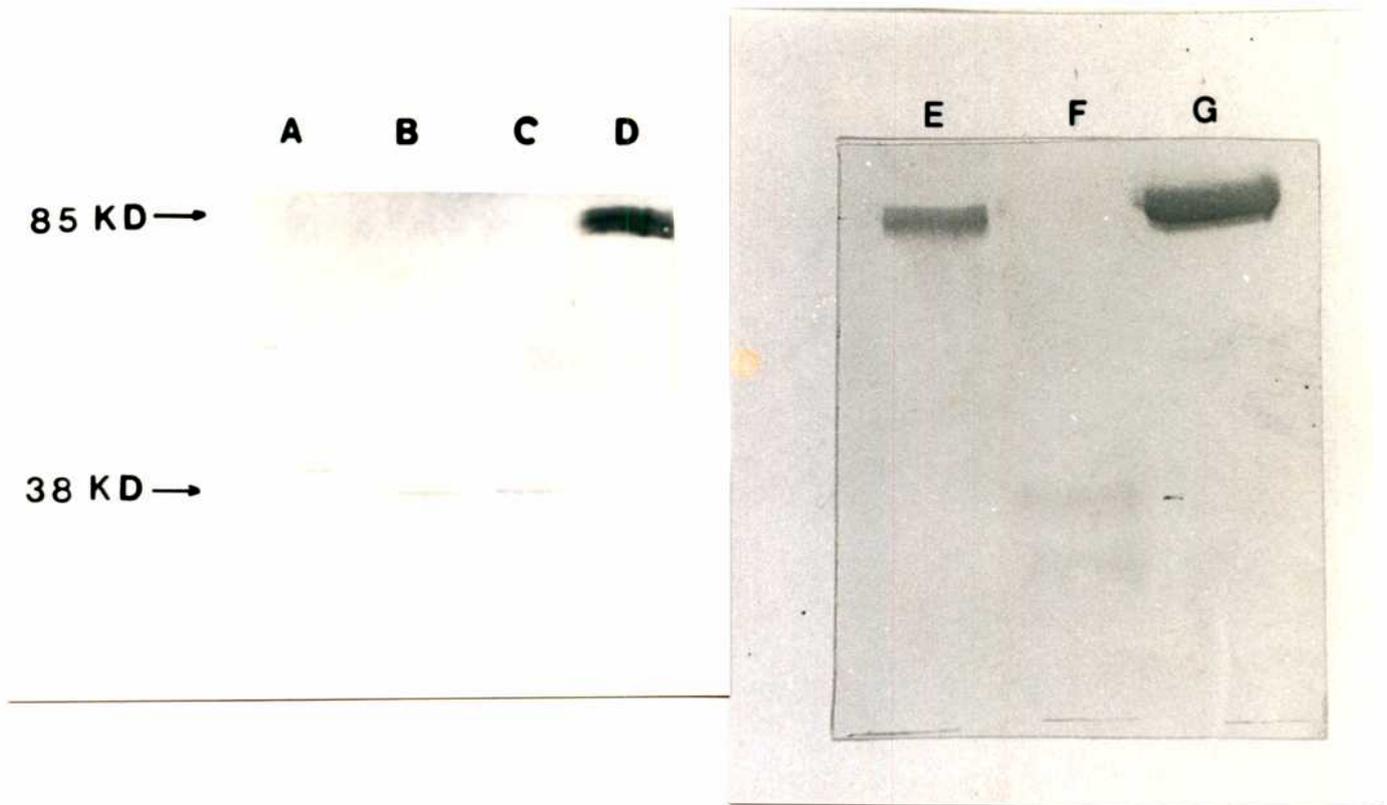


Fig. II.5 Presencia de miniplasminógeno en el plasma de pacientes sépticos

SDS-PAGE/Western blot realizado según Materiales y Métodos y revelados con antisuero policlonal antiplasminógeno humano (A) y antisuero monoclonal altamente selectivo para el K5 del plasminógeno (B).

A,B,C y F: Plasma de pacientes sépticos filtrados por la columna de lisina sefarosa (concentrados 10 veces)

D,E y G: plasminógeno humano normal.

II.6- CONCLUSIONES

Las conclusiones que sugieren los resultados de los ensayos II.2, II.3, II.4 y II.5 permiten esclarecer cuál sería la causa del descenso de los niveles plasmáticos del Plg en los pacientes sépticos.

El hecho de que este grupo de pacientes sépticos presentó niveles disminuidos de plasminógeno, concentración normal de α_2 -antiplasmina (ambas proteínas de síntesis hepática y depuración conjunta) y altos niveles de complejo EAPI (marcador de activación neutrófila) indujeron a pensar que el descenso en los niveles del zimógeno podrían deberse a la acción proteolítica de las enzimas leucocitarias.

Las experiencias realizadas permitieron comprobar que a) el Plg es degradado in vitro por la elastasa y el extracto leucocitario, dependiendo de la concentración de enzima; b) que la degradación in vitro del Plg genera varios fragmentos reconocibles por antisueros policlonales antiPlg, uno de los cuales presenta actividad plasmínica y contiene al K5 (miniplasminógeno); c) cuando la exposición de Plg a las proteasas es continua, se regeneran fragmentos sin actividad plasmínica y no reconocibles por los antisueros utilizados; d) cuando los polimorfosnucleares son degranulados al 50% en presencia de Plg, los inhibidores de proteasas plasmáticos no alcanzan para inhibir la degradación del Plg y e) en el plasma del 33% de los pacientes sépticos se detectan fragmentos de plasminógeno similares a los obtenidos por degradación del Plg in vitro.

Los resultados señalados sugieren que, efectivamente, la causa principal del descenso de los niveles plasmáticos de Plg sería la acción proteolítica de las enzimas leucocitarias, ya que se demostró que la degradación se produce tanto in vitro como in vivo. El hecho de que los fragmentos sólo se encuentren en el 33% de los pacientes hablaría de una mayor velocidad de depuración de esos fragmentos o una degradación exhaustiva con la generación de fragmentos no reconocibles por los antisueros, antiplasminógeno y anti K5 del plasminógeno.

III- ACTIVIDAD FIBRINOLITICA DEL MINIPLASMINOGENO

En resumen, los resultados expuestos demuestran que el descenso de los niveles de plasminógeno encontrado en los pacientes sépticos, podría ser la resultante de la acción proteolítica de las enzimas leucocitarias símil elastasa, sobre dicho zimógeno. Esta hipótesis está basada en el hecho de que la elastasa pura, el extracto de enzimas leucocitarias y los polimorfonucleares degranulados inducen in vitro una proteólisis del plasminógeno generando distintos fragmentos, entre ellos el miniplasminógeno (el único con actividad enzimática potencial) y que estos fragmentos han sido detectados en el plasma de algunos pacientes sépticos con activación neutrófila.

Dada la probabilidad de que el miniplasminógeno se encuentre presente en el sitio de inflamación, surgió el interrogante de si ese miniplasminógeno era eficaz como agente fibrinolítico.

En estudios realizados con sustratos cromogénicos diversos autores han señalado que el miniplasminógeno es más fácilmente activable que el plasminógeno nativo^{194,203}. Lo que resta es tratar de establecer el potencial fibrinolítico del miniplasminógeno cuando es activado por t-PA (principal activador fisiológico implicado en la lisis del coágulo).

Los ensayos que se detallan a continuación pretenden esclarecer esta disyuntiva, estudiando el proceso de activación del miniplasminógeno por diversos activadores y la acción de la enzima activa miniplasmina.

III.1- ACTIVIDAD DE PLASMINA Y MINIPLASMINA SOBRE UN COAGULO DE FIBRINA FRESCO

La miniplasmina consiste en dos cadenas polipeptídicas, la cadena liviana (561-790 aa) idéntica a la de la plasmina, que presenta el sitio activo y una cadena peptídica pesada, más corta que la presente en la molécula de plasmina^{18,22,199}. El objetivo de estos ensayos fue estudiar las propiedades fibrinolíticas de la miniplasmina y compararla con la plasmina.

Se agregaron distintas concentraciones de las enzimas a un coágulo de fibrina recientemente preparado registrándose el tiempo de lisis en cada ensayo. La Fig. III.1.A. muestra los tiempos de lisis obtenidos en función de la concentración de plasmina o miniplasmina. La plasmina es ligeramente más efectiva que la miniplasmina, para concentraciones menores de 0,3 μM, dado que el tiempo de lisis de la primera fue menor.

Para las concentraciones superiores a 0,4 μM, la miniplasmina presentó una actividad fibrinolítica ligeramente mayor. Este hecho podría deberse a que la miniplasmina difundiría más rápido que la plasmina a través del coágulo por ser una molécula más pequeña. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Moroz en los que señala que para las concentraciones por encima de 0,6 μM, la miniplasmina es más efectiva para lisar fibrina¹⁹⁹.

Cuando la coagulación del fibrinógeno ocurre en presencia de plasmina o miniplasmina, los tiempos de lisis se acortan significativamente (Fig. III.1.B.). Este acortamiento es más notorio en la plasmina que en la miniplasmina. Los tiempos de lisis cuando se coagula en presencia de plasmina son $75 \pm 4\%$ (n=3) más cortos que cuando se agrega plasmina luego de la formación del coágulo. En el caso del miniplasmina el acortamiento promedio es de $60 \pm 5\%$ (n=3), en todas las concentraciones estudiadas. La actividad lítica de ambas enzimas es similar a concentraciones mayores a 0,5 μM.

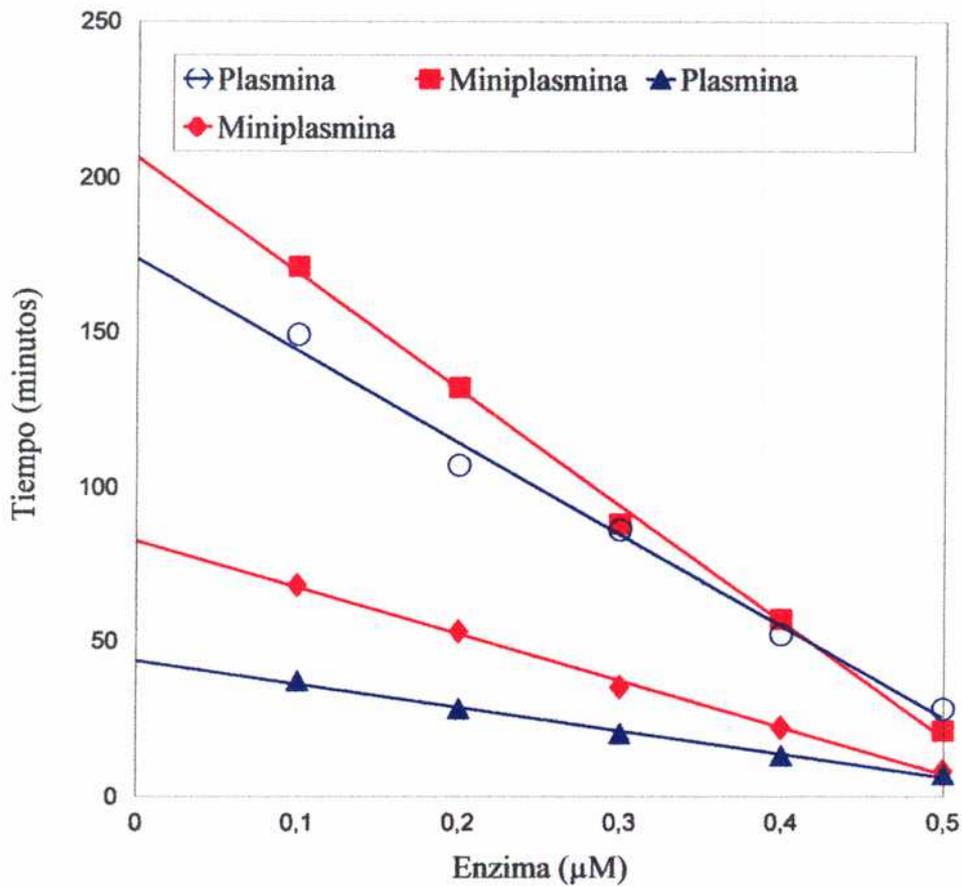


Fig. III.1 Tiempo de lisis en función de la concentración de la enzima.

A) A un coágulo recientemente preparado se agregan distintas concentraciones de plasmina y miniplasmina y se registra el tiempo de lisis total (curvas superiores).

B) Se coaguló fibrinógeno en presencia de plasmina y miniplasmina y se monitorea el tiempo de lisis total (curvas inferiores).

Los puntos son el promedio de tres determinaciones

III.2- ACTIVIDAD DE MINIPLASMINA FRENTE A LOS SUSTRATOS CROMOGENICOS

La plasmina hidroliza los sustratos cromogénicos liberando p-nitroanilina, de acuerdo a la cinética Michaeliana ^{201,203}.

Se estudió la actividad amidolítica de miniplasmina sobre los sustratos cromogénicos H-D-Val-Leu-Lys pNA y MML.TyrArg pNA , sustratos específicos para plasmina y el H-D-Phe-Pip-Arg pNA, sustrato para trombina. Se incubó miniplasmina (o plasmina) con 8 concentraciones distintas, de cada uno de los sustratos (n=2). Se graficó absorbancia vs. tiempo y se calcularon las velocidades iniciales para cada concentración de sustrato y luego se graficó 1/V inicial.

Se calculó el Km y la constante catalítica kc para plasmina y miniplasmina

Los resultados obtenidos son:

		Miniplasmina	Plasmina
H-D-Val-Leu-Lys pNA	Km (mM)	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02
	kc (S ⁻¹)	12,1 ± 0,4	11,8± 0,5
H-D-Phe-Pip-Arg pNa	Km (mM)	1,3 ± 0,1	1,0± 0,1
	kc (S ⁻¹)	13,8 ± 0,9	10,1± 0,9
MML-Tyr-Arg-pNA	Km (mM)	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01
	kc (S ⁻¹)	12.4 ± 0.4	12.2 ± 0.5

Al igual que la plasmina, la miniplasmina tiene poca afinidad para el sustrato de trombina y en cambio presenta una afinidad mayor (Km 0.14) para los dos sustratos específicos de plasmina. La miniplasmina cataliza la hidrólisis de los sustratos cromogénicos en forma similar a la de la plasmina; este hecho indicaría que la porción de la cadena pesada formada por los residuos 1→441 no intervendría en la catálisis de los sustratos cromogénicos. Estos datos son similares a los descritos por Takada y Christensen quienes no encuentran diferencias significativas en los parámetros cinéticos de la plasmina y miniplasmina ^{203,231}. La eficiencia catalítica de la plasmina y la miniplasmina son similares frente a los sustratos específicos de plasmina.

III.3- ACTIVACION DE MINIPLASMINOGENO POR UROQUINASA

La uroquinasa es un activador exógeno del plasminógeno, de uso general con fines terapéuticos, que activa plasminógeno en forma sistémica.

Se investigó la capacidad de la uroquinasa para activar al miniplasminógeno a miniplasmina, comparándolas con la activación del plasminógeno. Se incubaron miniplasminógeno (plasminógeno), uroquinasa y el sustrato cromogénico D-Val-Leu-Ly pNa. La concentración de plasmina, se calculó a partir de las absorbancias a 405 nm, a distintos tiempos según se describió en Materiales y Métodos III.3.

La Fig. III.2. muestra los resultados obtenidos cuando la activación se llevó a cabo con dos concentraciones de uroquinasa (10 y 30 U/ml). Se observa que el miniplasminógeno es activado por uroquinasa con una cinética similar al plasminógeno. Cuando se utilizan 10 unidades de uroquinasa la velocidad de activación de plasmina es mayor que la velocidad de activación de miniplasmina; cuando la activación se realiza con 30 unidades de uroquinasa la diferencia entre las velocidades de activación es menos evidente. Los resultados encontrados están de acuerdo a trabajos previos en los cuales se señala que el miniplasminógeno es activable, por uroquinasa, a miniplasmina siguiendo una cinética Michaeliana igual que la plasmina²⁰¹.

Esta similitud entre ambas cinéticas de activación indicaría que en la activación de Plg y miniplasminógeno, por uroquinasa, intervienen fundamentalmente los residuos aminoacídicos 561-790 correspondientes a la cadena liviana de la plasmina, intacta en la molécula de miniplasmina.

La Fig. III.3. muestra que el fibrinógeno no afecta la velocidad de activación del miniplasminógeno por uroquinasa, mientras que la fibrina aumenta alrededor de un 10% la velocidad de activación.

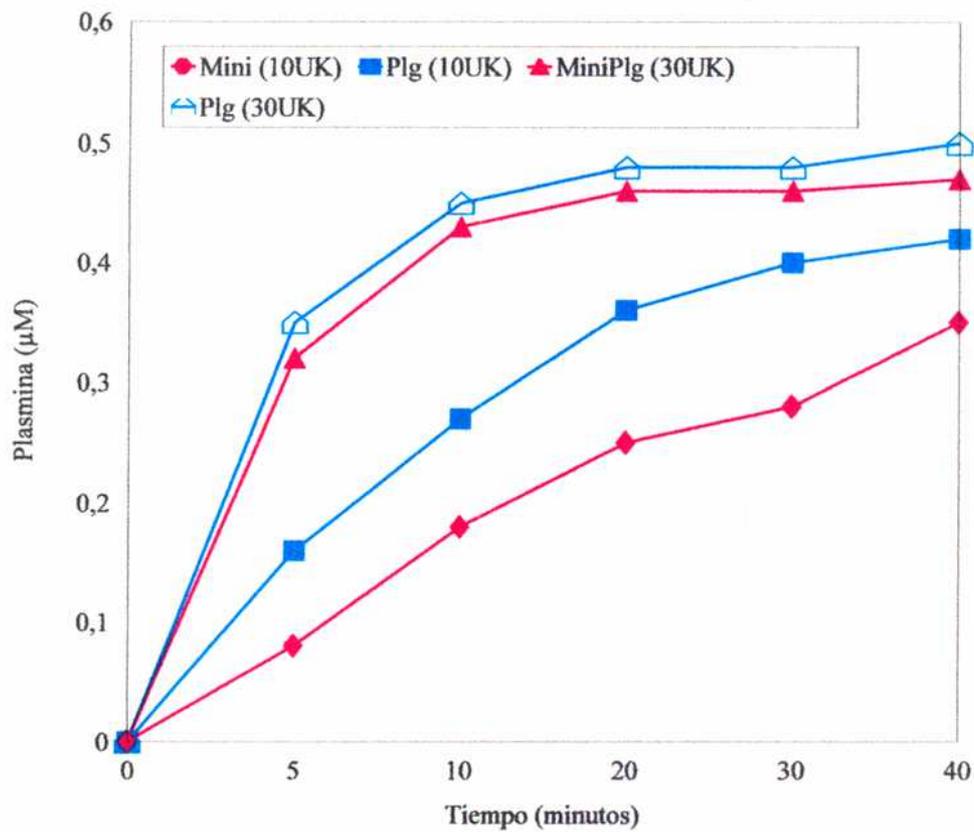


Fig. III.2- Activación de miniplasminógeno por uroquinasa.

La cantidad de uroquinasa utilizada fue 10 UI/ml y 30 UI/ml

La concentración de plasmina se calculó según lo descrito en Materiales y Métodos y cada punto corresponde al promedio de 3 ensayos.

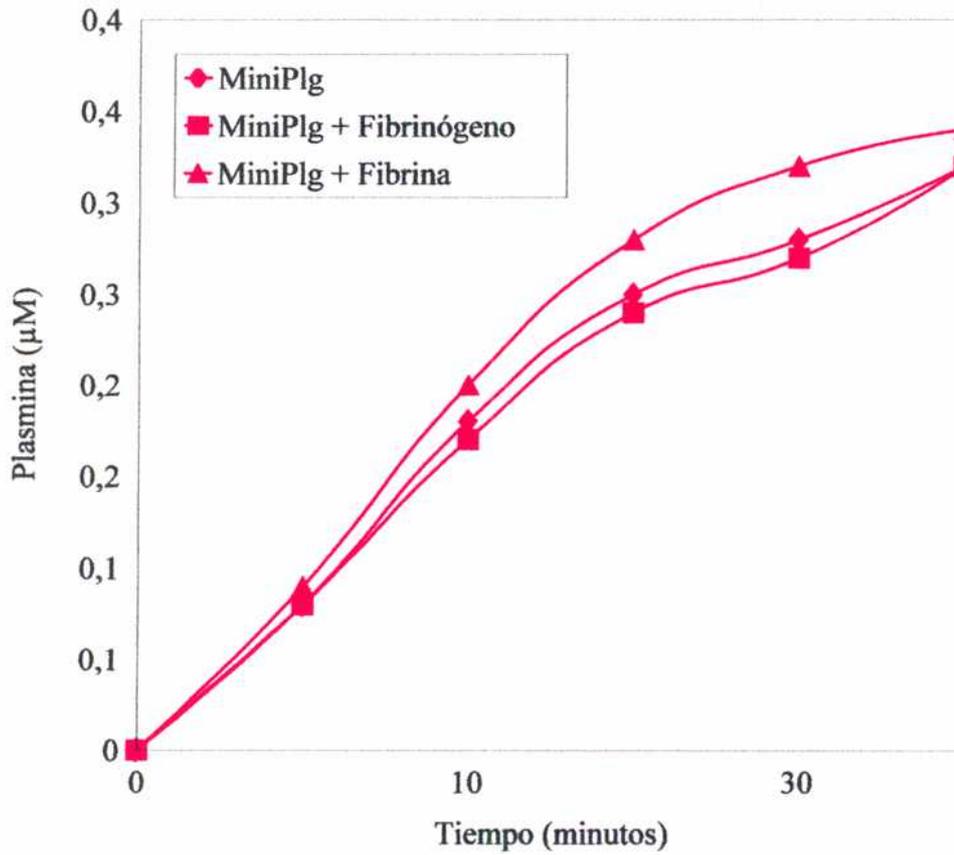


Fig. III.3- Efecto del fibrinógeno y la fibrina sobre la activación de miniplasminógeno en presencia de 10 UI/ml de uroquinasa.

La concentración de plasmina se calculó según lo descrito en Materiales y Métodos y cada punto corresponde al promedio de 3 ensayos.

III.4- ACTIVACION DE MINIPLASMINOGENO POR ESTREPTOQUINASA

La estreptoquinasa (SK), otro activador exógeno del plasminógeno actúa a través de la formación de un complejo activo [SK-P1g] que potencia la generación de plasmina ^{70,91,93}. Para investigar si el miniplasminógeno es activable por la estreptoquinasa se incubaron miniplasminógeno, SK y el sustrato cromogénico H-D-Val-Leu-Lys-pNa, monitoreando la plasmina generada en la unidad de tiempo, a través de la determinación espectrofotométrica de p-nitroanilina.

La Fig. III.4. muestra que la velocidad de activación de Plg es significativamente mayor que la del miniplg cuando se activa con niveles catalíticos de SK. La menor velocidad de activación del miniplasminógeno podría deberse a la incapacidad de formar el complejo [miniPlg. SK] o a una menor eficiencia en la activación del miniPlg por el complejo [miniPlg. SK]; esta segunda hipótesis tendría mayor posibilidad ya que Powell ha demostrado, a través de un seguimiento por electroforesis y utilizando anticuerpos monoclonales, que el miniplasminógeno forma un complejo con la SK ²⁰¹.

El fibrinógeno y la fibrina aumentan significativamente la velocidad de activación del miniPlg por la SK (Fig. III.5), resultados que concuerdan con los descritos por Takada ²⁰³ y son similares a los descritos para la activación de Plg mediada por SK. La constante catalítica para la activación de Plg por SK aumenta con la concentración de fibrinógeno o fibrina, probablemente por la formación de un complejo trimolecular SK-Plg-fibrina (fibrinógeno) ⁹³. La mayor velocidad de activación de miniPlg mediada por SK encontrada, podría deberse entonces a la formación de un complejo trimolecular estreptoquinasa, Plg y fibrinógeno (fibrina), que sería más eficaz para activar miniPlg que el complejo bimolecular conformado por el miniPlg y la SK.

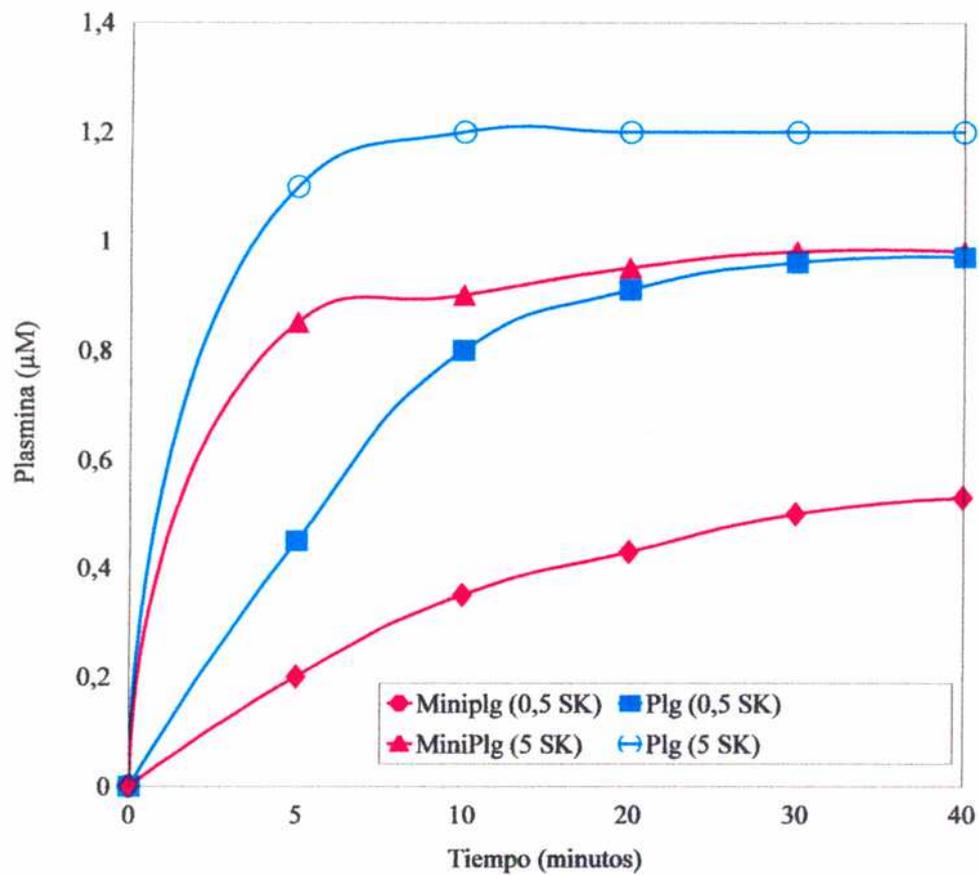


Fig. III.4- Activación de miniplasminógeno por estreptoquinasa.

Dos concentraciones distintas de streptokinasa, 0,5 UI/ml y 5 UI/ml se mezclaron con miniplasminógeno y plasminógeno. La concentración de plasmina se determinó espectrofotométricamente. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones.

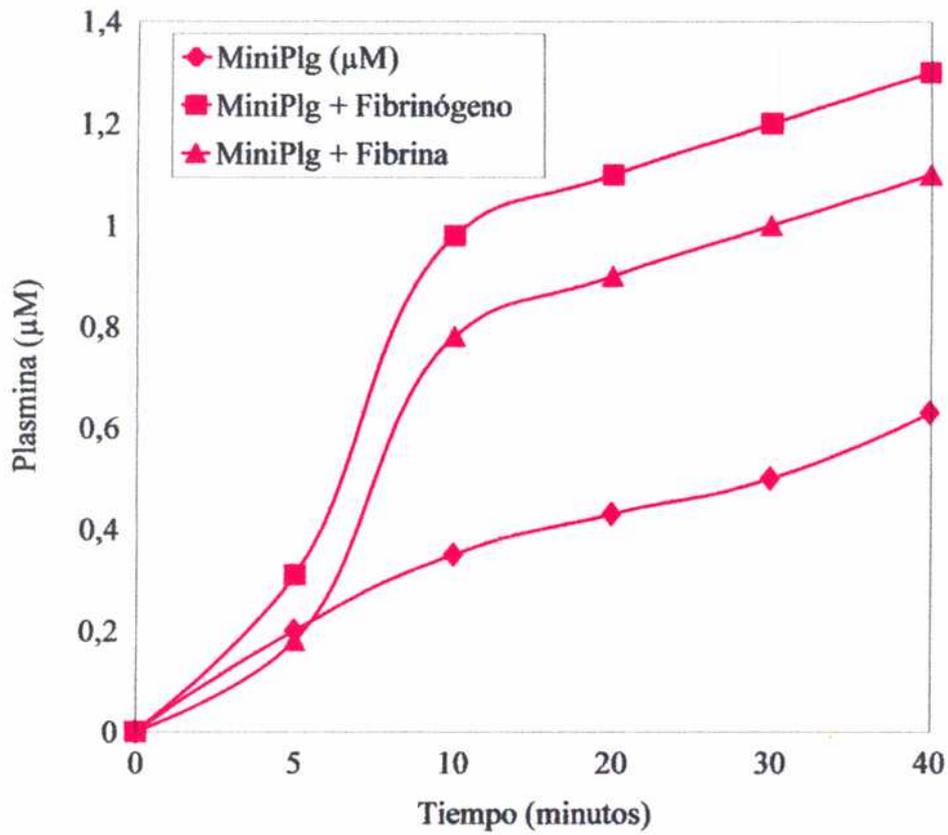


Fig. III.5- Efecto de fibrina y fibrinógeno sobre la activación de miniplasminógeno mediado por estreptoquinasa.

La activación de miniplasminógeno se llevó a cabo en presencia de fibrinógeno (1mg/ml) y películas de fibrina. Los puntos corresponden al promedio de 3 ensayos.

III.5- ACTIVACION DEL MINIPLASMINOGENO POR t-PA RECOMBINANTE (rt-PA)

La activación del plasminógeno por t-PA es un mecanismo de catálisis heterogénea complejo, donde la fibrina es simultáneamente sustrato de la plasmina generada y catalizador de la interacción t-PA-plasminógeno^{27,39,47}. Hoylaert postuló la formación de un complejo ternario Plg-Fib-tPA que permitiría un proceso de activación más efectivo y una localización de la plasmina sobre el coágulo; este modelo ternario es consistente con los datos cinéticos encontrados por numerosos investigadores^{79,80,203}.

Para investigar si el miniplasminógeno era activable por t-PA (comparándolo con el Plg) y si la fibrina también catalizaba dicha reacción, se realizaron diversas experiencias utilizando como activador un t-PA recombinante (rt-PA) con propiedades bioquímicas muy similares al t-PA liberado por la célula endotelial.

Se incubó miniplasminógeno o plasminógeno, con distintas concentraciones de t-PA y sustrato cromogénico H-D-Val-Leu-Lys pNA. Se monitoreó la generación de pNA espectrofotométricamente y se calculó la concentración de plasmina en cada ensayo. La Fig. III.6. muestra la generación de plasmina (o de miniplasmina) en función del tiempo. El plasminógeno y el miniplasminógeno son pobremente activados en ausencia de fibrina, aún a altas concentraciones de rt-PA. En todas las concentraciones estudiadas la velocidad de activación del miniplasminógeno fue mayor que la de plasminógeno nativo.

Cuando la reacción se realizó en tubos conteniendo películas de fibrina, la velocidad de generación de plasmina aumentó en mayor medida que la de miniplasmina. A los 90 minutos, prácticamente todo el plasminógeno fue convertido a plasmina, en cambio sólo se activó una pequeña porción de miniplasminógeno (concentración de miniPlg a las 2 hs. 0,15 μ M). Este comportamiento se observó con todas las concentraciones de t-PA estudiadas.

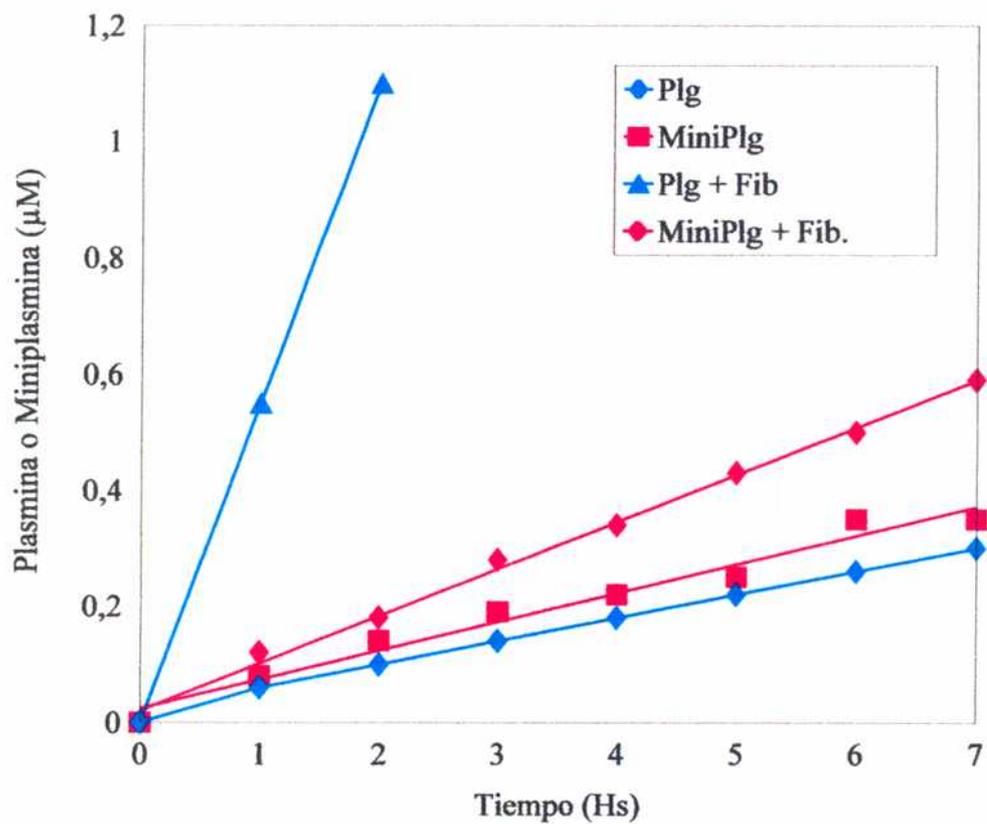


Fig. III.6- Activación de miniplasminógeno por rt-PA. Efecto de la fibrina.

Se incubaron plasminógeno o miniplasminógeno con rt-PA (Cf 20 UI/ml) en presencia de H-D-Val-Leu-Lys pNA; la plasmina generada se calculó a partir de los valores de Abs a 405nm. Los ensayos se repitieron en tubos conteniendo películas de fibrina (Fib)

Cada punto es el promedio de 3 determinaciones.

Para estudiar mejor esta diferencia, se activó al miniplasminógeno en presencia de monómeros de fibrina solubles y con menor concentración de rt-PA. Para investigar si los sitios de unión a lisina estaban involucrados en la catálisis por fibrina, se realizaron ensayos en presencia y ausencia de ácido ϵ -aminocaproico (EACA).

En la Fig. III.7.B. se puede observar que la activación del plasminógeno, presenta una fase "lag" durante la primera hora, en cambio la velocidad de generación de miniplasmina es lineal. A los 60 minutos se generaron alrededor de 0,1 μmol de plasminógeno, en cambio, solo se generó menos de 0,001 μmol de plasmina. Cuando la reacción se realizó en presencia de ácido ϵ -aminocaproico el efecto potenciador del monómero de fibrina sobre la activación del plasminógeno nativo fue completamente abolido. En la activación del miniplasminógeno, el EACA utilizado a la misma concentración, disminuyó sólo parcialmente el efecto catalítico del monómero de fibrina (Fig. III.7.A.) La inhibición total del efecto catalítico de los monómeros sobre la activación del plasminógeno por EACA confirma que el Plg se une a la fibrina, principalmente por los distintos sitios de unión a lisina (LBS) de su molécula. La potenciación inducida por los monómeros de fibrina sobre la activación de miniplasminógeno mediada por rt-PA podría deberse en parte a interacciones con residuos lisina independientes de los LBS y a través del sitio aminohexil del K5.

De los datos expuestos se puede concluir que el miniplasminógeno es activable lentamente en presencia de rt-PA en sistemas puros en mayor o igual magnitud que el Glu-plasminógeno, pero el efecto catalítico de los monómeros de fibrina solubles o de la fibrina misma es significativamente mayor en la activación del plasminógeno mediado por t-PA que en la activación del miniplasminógeno. Se sabe que la fibrina cataliza la activación del Plg por la formación de un complejo inicial ternario, a través del sitio aminohexil presente en el K5 del Plg y el dominio "finger" del t-PA⁷⁹. Luego la fibrina, parcialmente degradada incrementa la catálisis por unión de más Plg (a través de los sitios de unión a lisina) y más t-PA (a través del kringle 2 del t-PA)^{47,48}.

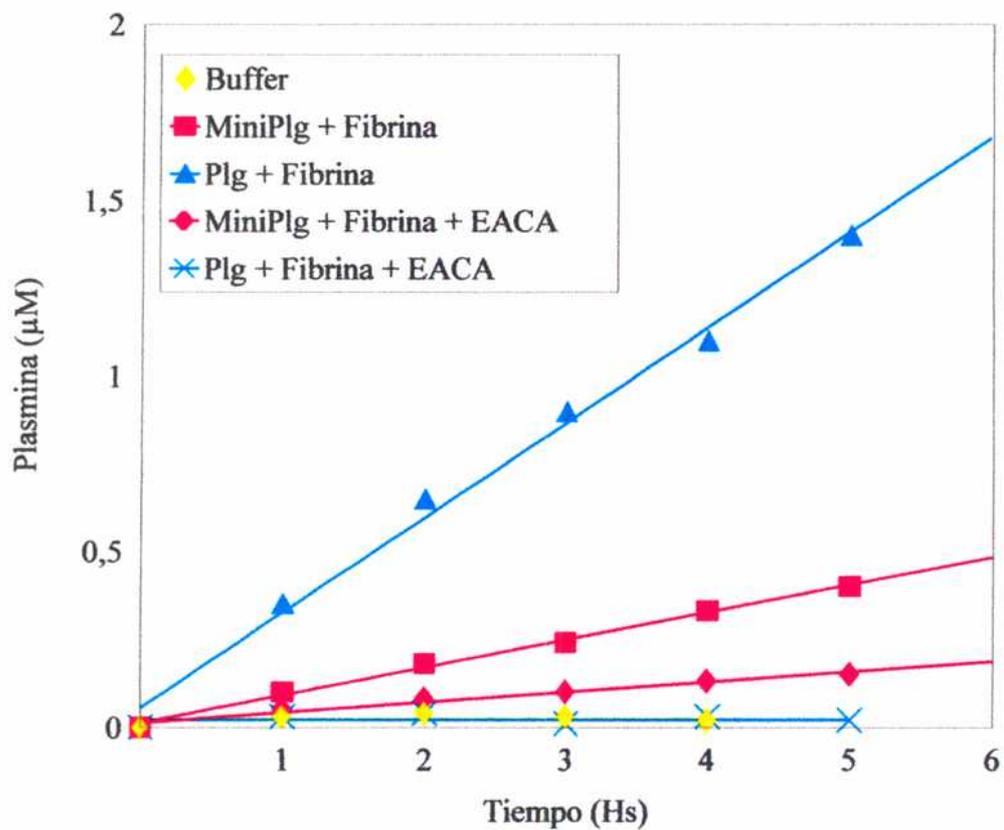
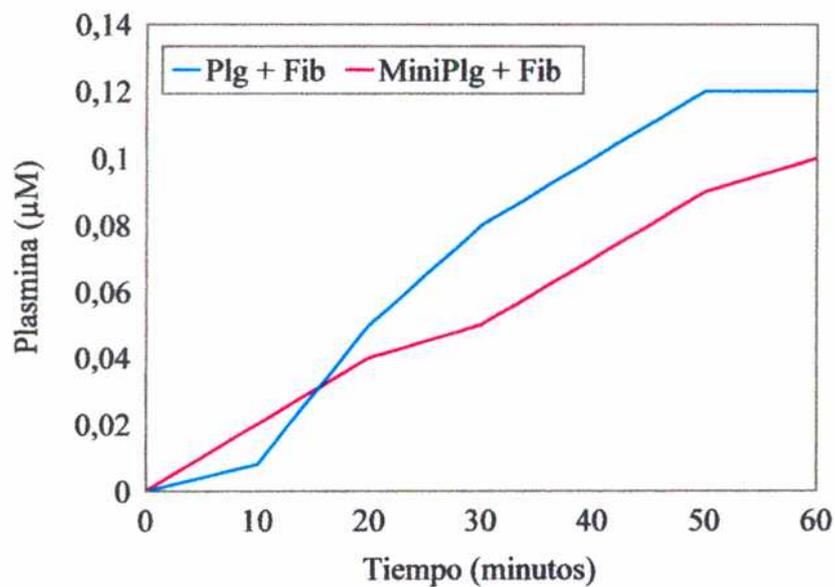
A**B**

Fig. III.7- Efecto de los monómeros de fibrina sobre la activación del miniplasminógeno mediado por t-PA. Acción del EACA.

El efecto catalítico de la fibrina sobre la activación de miniPlg por rt-PA sería menor porque fallaría la potenciación de la activación por la fibrina parcialmente degradada, proceso que requiere la presencia de los kringles 1→4 del plasminógeno (ausentes en el miniPlg) ^{18,79}.

En resumen, si bien el miniplasminógeno es activable por rt-PA, en presencia de su sustrato fisiológico, fibrina, el plasminógeno es activado por el rt-PA más eficientemente que el miniplasminógeno. (Fig.III.6 y Fig. III.7).

Diversos autores postulan al miniplasminógeno como un camino alternativo para la fibrinólisis, basados en el hecho que el miniPlg es más fácilmente activable que el plasminógeno nativo; sin embargo esta afirmación se basa en sistemas modelos no fisiológicos. Si bien el miniplasminógeno es activable por uroquinasa, estreptoquinasa y t-PA en sistemas puros ^{42201,204}, los resultados expuestos demuestran que en presencia del activador fisiológico y el sustrato fisiológico (t-PA y fibrina) la activación del miniplasminógeno es mucho menor que la del plasminógeno.

III.6- COMPARACION DEL EFECTO FIBRINOLITICO DEL PLASMINOGENO Y MINIPLASMINOGENO EN SISTEMAS PURIFICADOS Y EN PLASMA HUMANO NORMAL LIBRE DE PLASMINOGENO

Con los ensayos descritos anteriormente se comprobó que el miniplasminógeno puede ser activado a miniplasmina por el rt-PA y que la miniplasmina es capaz de lisar fibrina (ver III.1 y III.3). El objetivo de esta experiencia fue tratar de reflejar la situación fisiológica que se produce cuando, al formarse un coágulo, el plasminógeno (o el miniplasminógeno si está presente) queda atrapado en contacto íntimo con la red de fibrina y el t-PA es liberado por el éstasis venoso producido. Se determinaron los tiempos de lisis total de un coágulo formado a partir de fibrinógeno puro o a partir de plasma humano normal depletado de plasminógeno, en presencia de plasminógeno o miniplasminógeno y t-PA, en las concentraciones plasmáticas y agregados en el orden que indica cada ensayo (Tabla V).

La trombina utilizada es suficiente para producir la coagulación instantánea del fibrinógeno, por lo que el cronómetro se dispara conjuntamente con el agregado de trombina. Se realizaron tubos controles para verificar que el Plg, el miniPlg o rt-PA no lisaban el coágulo por sí solos.

En los ensayos A y B la formación de la red de fibrina se produce en presencia de Plg o miniPlg (similar a lo que ocurre fisiológicamente), en cambio en los ensayos A' y B' el Plg o el miniPlg son agregados luego que el coágulo ha sido formado.

Los resultados encontrados en cada ensayo son los detallados a continuación:

	Ensayo A	Ensayo B	Ensayo A'	Ensayo B'
	Fib. libre Plg.	Fib. libre Plg.	Fib. libre Plg.	Fib. libre Plg.
	rt-PA	rt-PA	trombina	trombina
	Plg	Miniplg	Plg	miniPlg
	Trombina	Trombina	rt-PA	rt-PA
Tiempo de lisis ($x \pm DS$, min, n=3)	2,3 \pm 0,6	9,8 \pm 0,1	11,2 \pm 0,7	23,4 \pm 0,8

Tabla V: Tiempo de lisis total en sistemas puros. Efecto del orden de agregado de los reactivos.

Cuando el agregado de Plg o miniPlg se realiza una vez formado el coágulo de fibrina, los tiempos de lisis se alargan (ensayo A' y B'); en el caso del Plg, el tiempo de lisis del ensayo A' es alrededor de 5 veces el tiempo de lisis cuando el coágulo se forma en presencia del Plg, en cambio para el miniPlg el alargamiento del tiempo es sólo 2.5 veces mayor (ensayo B vs. ensayo B').

Estos resultados podrían deberse a dos efectos: a) por un lado, al ser el miniPlg una molécula pequeña difundiría dentro del coágulo con mayor facilidad que el Plg, por lo tanto no sería tan importante su presencia en el instante de la formación de la red y b) la fibrina potencia mucho menos la activación del miniPlg que la del Plg, lo que hace que el efecto de estar o no en la red sea menos notorio en el caso del miniPlg.

Si bien cuando el sistema enzimático se agrega al coágulo ya formado, el efecto de alargamiento del tiempo de lisis es mayor para el plasminógeno que para el miniplasminógeno, el sistema Plg/rt-PA continúa teniendo un mayor potencial fibrinolítico ($t_{\text{lisis}}=11.2 \pm 0.7$ min.) que el sistema miniPlg/rt-PA ($t_{\text{lisis}}=23.4 \pm 0.8$ min.)

La Fig. III.8 muestra el tiempo de lisis del coágulo en presencia de miniplasminógeno y plasminógeno, en los ensayos A y B, en función de la concentración de enzima. El miniPlg es menos eficiente que el plasminógeno para producir la lisis del coágulo en sistemas puros a todas las concentraciones estudiadas (0.2-1.4 μM). A la concentración plasmática el tiempo de lisis total en presencia de miniplasminógeno ($9,8 \pm 0,1$ min.) es mayor que para el Plg ($2,3 \pm 0,06$ min.), es decir que el sistema rtPA/miniPlg presenta menos efecto lítico que el rt-PA/Plg a pesar de que la miniplasmina tiene, para concentraciones mayores a 0.4 μM , mayor actividad fibrinolítica. Estos resultados indicarían que en sistemas purificados, la activación de miniPlg mediado por rt-PA sería menor que la del plasminógeno.

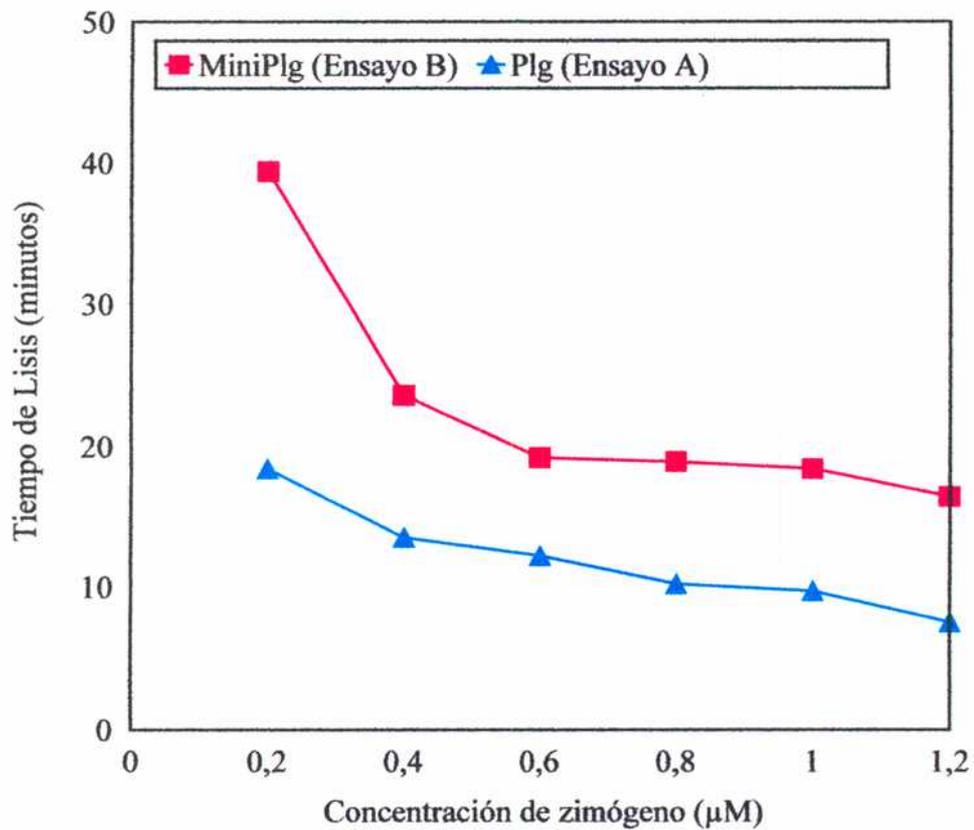


Fig. III.8- Tiempo de lisis del coágulo de fibrina como función de la concentración de zimógeno. Plasminógeno o miniplasminógeno fueron mezclados con fibrinógeno libre de Plg, rt-PA y coagulado con trombina. Se cronometró el tiempo de lisis total.

La Fig. III.9 muestra la concentración de dímeros D en el sobrenadante del coágulo formado en sistemas puros, a tiempos distintos. La concentración de dímeros D se consideró arbitrariamente como el 100%, cuando la lisis del coágulo en presencia de plasminógeno, fue completa.

El plasminógeno muestra una fase lag al comienzo del proceso lítico, en cambio el miniPlg produce dímeros D antes del primer minuto, pero luego la fibrinólisis mediada por el miniplasminógeno se torna lenta. Cuando los coagulos han sido totalmente lisados, la concentración de dímeros D liberados fue igual para ambos sistemas, pero la velocidad de producción de dímeros D es menor en la activación de miniPlg mediado por rt-PA que en la del Plg, para las dos concentraciones de zimógeno estudiadas.

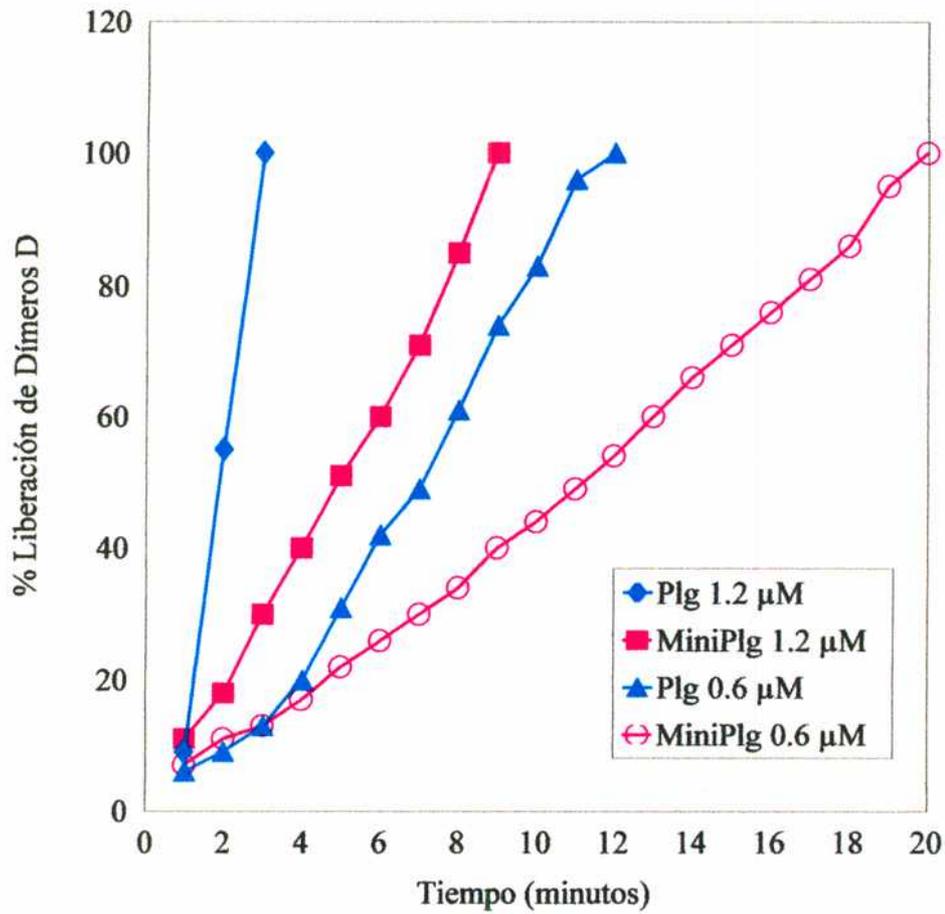


Fig. III.9- Liberación de dímeros D en sistemas purificados.

Se coaguló fibrinógeno libre de plasminógeno, en presencia de plasminógeno/rt-PA o miniplasminógeno /rt-PA y se determinó la concentración de dímeros D a medida que transcurrió la lisis.

Se determinaron los tiempos de lisis total de un coágulo formado a partir de un plasma depletado de Plg (actividad inmunológica negativa frente al anticuerpo policlonal anti Plg) en presencia de Plg o miniPlg en concentraciones plasmáticas y añadidos en el orden que indica cada ensayo (Tabla VI). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.

	Ensayo C	Ensayo D	Ensayo C'	Ensayo D'
	Plasma libre de Plg			
	Plg	Miniplg	Trombina	Trombina
	rt-PA	rt-PA	rt-PA	rt-PA
	Trombina	Trombina	Plg	Miniplg
Tiempo de lisis ($\bar{x} \pm DS$, min)	15 \pm 0,6	> 180	120 \pm 0,5	> 180

Tabla VI. Tiempo de lisis en medio plasmático libre de Plg.

En medio plasmático el miniPlg es incapaz de producir la lisis completa del coágulo en presencia de rt-PA (Tabla VI); en cambio el tiempo de lisis para el sistema rt-PA/Plg fue de 15 minutos. Aún después de 12 horas a 37°C los tubos del ensayo D contenían fibrina. La Fig.III.10 muestra la concentración de dímeros D en el sobrenadante, como indicador del desarrollo de la fibrinólisis. Si bien al comienzo hay liberación de dímeros D en el sistema miniPlg/rt-PA, luego la fibrinólisis parece ser inefectiva y la concentración de dímeros D nunca alcanza al 100%. El tiempo de lisis del ensayo C' es 8 veces mayor que el de C porque al añadirse Plg con el coágulo ya formado el Plg es transformado a plasmina fuera de la red y parte de la plasmina generada es rápidamente inhibida por la α_2 -antiplasmina y las otras proteasas plasmáticas. Al agregarse el miniPlg al coágulo ya formado es transformado a miniplasmina, la cual produce una rápida fibrinólisis inicial (presencia de dímero D en el sobrenadante) pero luego es inhibido por las proteasas plasmáticas sin lograr una disolución completa del coágulo. El análisis de los datos obtenidos muestra que en medio plasmático, al igual que en sistemas puros, la activación de miniPlg mediado por rt-PA es menor que la del Plg.

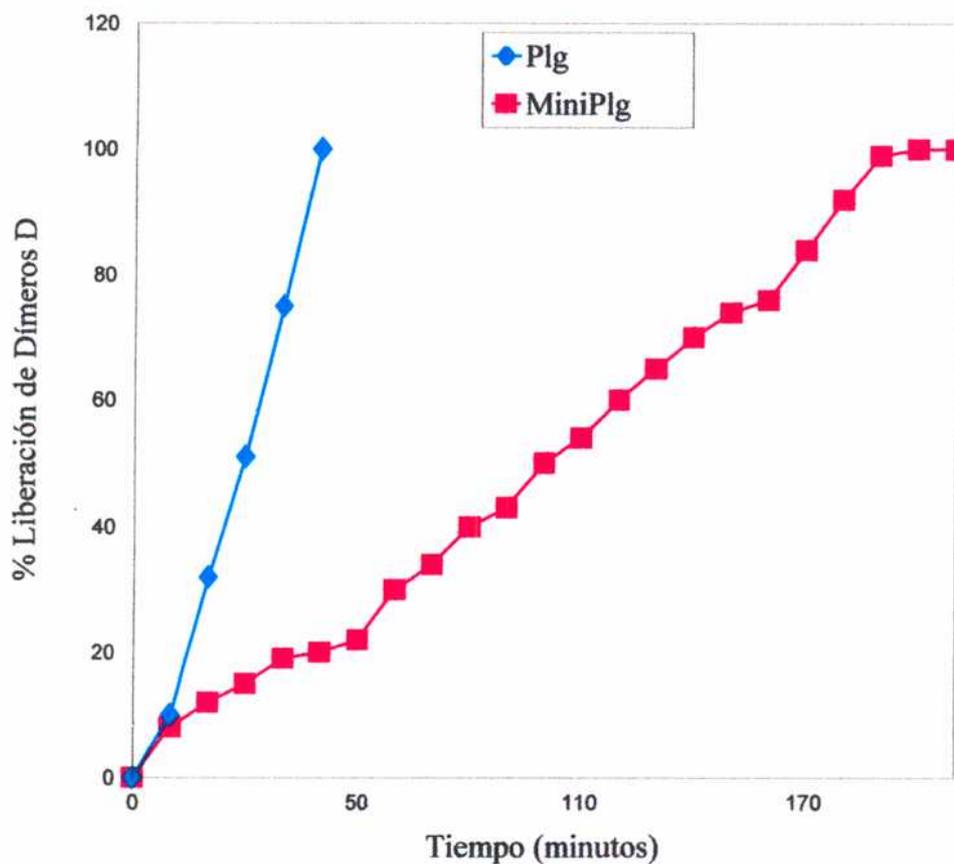


Fig. III.10 Liberación de dímeros D en plasmas depletados de plasminógeno en presencia de miniplasminógeno como una medida de la lisis del coágulo.

Cada punto es el resultado de 3 ensayos. La liberación de dímeros D nunca alcanza el 100%. (El 100% corresponde arbitrariamente a la concentración de dímeros D liberados por el sistema plasminógeno/rt-PA).

III.7- DETERMINACION DE LOS TIEMPOS DE LISIS EN PLASMA DE PACIENTES SEPTICOS LIBRE DE PLASMINOGENO

En los plasmas de los pacientes sépticos (PS) filtrados por las columnas de lisina-sefariosa, y concentrados dos veces, se investigó inmunológicamente la presencia de Plg y miniPlg. En cada uno de los plasmas negativos inmunológicamente para Plg y miniPlg (n=10), se determinó el tiempo de lisis cuando los mismos fueron coagulados en presencia de Plg/rt-PA y miniPlg/rt-PA. Cada una de las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los tiempos de lisis total obtenidos fueron:

	Plg/rt-PA	MiniPlg/rt-PA
Plasma sépticos (n=10)	19 ± 0,9 min.	> 180 min
Plasma normales (n=8)	15 ± 0,9 min.	> 180 min

Tabla VII- Tiempo de lisis en plasma de pacientes sépticos depletados de Plg.

No existen diferencias significativas entre los tiempos de lisis del coágulo en presencia de Plg/rt-PA, obtenidos con plasma de pacientes sépticos y los obtenidos a partir de plasma normal. Este hecho indicaría que la variación en la composición proteica que presentan los pacientes sépticos debido a la presencia de las proteínas reactantes de fase aguda no afecta el proceso fibrinolítico si hay plasminógeno suficiente.

III.8- CONCLUSIONES

En resumen, los resultados muestran que el miniplasminógeno puede ser transformado en miniplasmina, (enzima con actividad fibrinolítica) por el rt-PA. La velocidad de activación del miniplasminógeno por rt-PA respecto del plasminógeno,

depende de la presencia de fibrina. En ausencia de fibrina, la velocidad de activación del miniplasminógeno estudiada mediante sustrato cromogénico, es ligeramente superior a la del plasminógeno nativo (Fig. III.6) pero en presencia de fibrina la velocidad de generación de plasmina es 3 veces la velocidad de producción de miniplasmina (Fig. III.6). Este hecho es explicable, si se recuerda que la fibrina cataliza la activación de Plg mediada por t-PA a través de un mecanismo secuencial ordenado en el cual participan los sitios LBS del plasminógeno ausentes en el miniplasminógeno. El t-PA primero, y el Plg después, se unirían a la fibrina formando un complejo ternario cíclico sobre la red. La unión de Plg a fibrina está mediada por los sitios de unión a lisina (LBS) y el sitio aminohexil, este último presente en el K5.

La fibrina parcialmente degradada uniría más Plg (por sitios LBS) y más t-PA, aumentando la eficiencia catalítica. Esta última potenciación requeriría la presencia de los dominios K1-4 del Plg, ausentes en la molécula de miniPlg; este último hecho explicaría el menor efecto catalítico de la fibrina sobre la activación de MiniPlg por rt-PA.

Dado que: a) la miniplasmina es capaz de lisar fibrina igual o más rápidamente que la plasmina, b) el hecho que el sistema enzimático miniplasminógeno/rt-PA tarda aproximadamente 4 veces más tiempo que el sistema Plg/rt-PA en lisar un coágulo de fibrina fresca y c) el sistema miniplasminógeno/rt-PA es incapaz de lisar completamente un coágulo fresco formado a partir de plasma humano normal (Tabla VII) queda demostrado que lo que falla es el proceso de activación de miniPlg por t-PA y no la acción lítica de la enzima.

Así, el miniplasminógeno que se encuentra presente en el plasma de los pacientes sépticos sería incapaz de actuar como agente fibrinolítico en forma eficiente, acentuando aún más el estado hipofibrinolítico que presentan estos individuos.

Discusión

I- PLASMINOGENO: UN PARAMETRO HEMOSTATICO IMPORTANTE EN LOS PACIENTES SEPTICOS

Sepsis es la respuesta sistémica a la infección con una alta morbilidad y mortalidad; la respuesta inflamatoria del huésped se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. La falla orgánica múltiple progresiva, que suele estar acompañada por depósitos de fibrina y microtrombos, es la causa de muerte más frecuente asociada con sepsis y shock séptico. Fisiológicamente la fibrina es removida eficientemente por el sistema fibrinolítico, el cual está constituido por un zimógeno, el plasminógeno, que es activado a plasmina por la acción de activadores específicos.

Diversos autores han demostrado que los pacientes sépticos presentan alteraciones en el sistema de coagulación y fibrinolítico, además de otras anomalías implicadas en esta patología. Estas alteraciones podrían conducir a una oclusión trombotica de la microvasculatura, originando un daño tisular irreversible, posiblemente causante principal de la falla orgánica múltiple.

Las endotoxinas de las bacterias Gram negativas inducen la liberación de diferentes mediadores celulares, como el factor de necrosis tumoral e interleuquinas de los macrófagos y de las células endoteliales. La acción de los distintos mediadores induce la adhesión de leucocitos a la célula endotelial y la migración de las mismas hacia el sitio de injuria, donde frecuentemente los neutrófilos se degranulan liberando diversas proteasas, denominadas también enzimas simil elastasa. Cuando estas proteasas neutrófilas superan la capacidad inhibitoria de los inhibidores plasmáticos de proteasas, inducen el llamado “síndrome proteolítico no específico”, durante el cual numerosas proteínas plasmáticas y de la matriz extracelular son destruidas. La elastasa es capaz de digerir fibrinógeno, numerosos factores de coagulación y antitrombina III, lo cual afecta al sistema de coagulación.^{188-200,253}

Las enzimas similar a la elastasa también regulan al sistema fibrinolítico; la digestión in vitro del plasminógeno nativo con elastasa origina varios fragmentos, entre ellos el miniplasminógeno, el cual no tiene sitios LBS y es incapaz de unirse a fibrina y a superficies celulares.¹⁹⁹⁻²⁰³

El miniplasminógeno es activable por uroquinasa, estreptoquinasa y t-PA a miniplasmina, la cual presenta actividad amidolítica similar a la plasmina.

En este trabajo se estudiaron los componentes del sistema fibrinolítico y del sistema de coagulación en pacientes sépticos en forma longitudinalmente durante siete días, para tratar de establecer si la probabilidad de supervivencia del paciente podría expresarse en función de algún parámetro hemostático (Resultados parte I).

45 pacientes sépticos consecutivos, diagnosticados según la Conferencia Consenso de 1992²¹¹, que ingresaron a la misma unidad de terapia intensiva, **presentaron un estado hipercoagulable e hipofibrinolítico, al día del diagnóstico de sepsis, considerado el día 1 del estudio** (Tablas I.2.1, I.2.2 y I.3.1)

Los altos niveles de fibrinógeno y fundamentalmente los niveles plasmáticos disminuidos de los inhibidores fisiológicos, antitrombina III, proteína C y cofactor II de la heparina, habrían contribuido al estado hipercoagulable en estos pacientes, confirmado por los elevados valores del complejo trombina-antitrombina III (TAT).

Los pacientes sépticos estudiados también presentaron los factores de coagulación K-dependientes (II, VII, IX y X) disminuidos, pero dicho descenso no mostró diferencia significativa con los pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva (Tabla I.2.1).

La disminución de la actividad plasmática de las proteínas K-dependientes se debió principalmente, a la baja ingesta de vitamina K que tienen estos pacientes

Cuando estos parámetros se estudiaron en forma seriada entre pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes, se encontró **que los factores de coagulación II,**

VII y IX y los inhibidores fisiológicos, antitrombina III y proteína C fueron significativamente más altos en los pacientes que sobrevivieron.

Este comportamiento se mantuvo durante los 7 días del estudio (Tabla I.2.2).

En los pacientes que no sobrevivieron los niveles de fibrinógeno están más elevados en el día 7 que en el día 1.

Estos resultados estarían indicando que la hipercoagulabilidad presente en el momento del diagnóstico de sepsis se mantiene durante la evolución y se acentúa aún más en los pacientes que no sobrevivieron al evento séptico. Estos hallazgos también fueron reportados por los trabajos de Hesselvik, Phillipé, Llorente y Massignon en estudios europeos y estadounidenses.^{218,220,222,223}

Los niveles plasmáticos de los componentes del sistema fibrinolítico indican que **los pacientes estudiados presentan un estado hipofibrinolítico marcado principalmente por el descenso de los niveles de plasminógeno (Tabla I.3.1)**. Esta disminución también fue hallada por Llorente en pacientes sépticos y por Hesselvik en pacientes con shock séptico.^{218,222}

En el día 1 del estudio el grupo séptico presentó niveles plasmáticos de plasminógeno significativamente menores que los de ambos grupos controles. Al estudiar esta proteína en forma seriada, se observó un comportamiento claramente distinto entre los pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes (Tabla I.3.2.).

Los sobrevivientes tuvieron valores de plasminógeno disminuidos o en el límite inferior normal al día 1 y luego se normalizaron hacia el día 7. En cambio, los no sobrevivientes mantuvieron los niveles de plasminógeno bajos durante los 7 días del estudio. Llorente sugiere que el descenso de los niveles de plasminógeno se debe a una disminución en la síntesis de la proteína o a un aumento en el consumo de Plg; sin embargo esta hipótesis no concuerda con el hecho de que los niveles de α_2 -antiplasmina estén en el rango normal en los pacientes sépticos, tanto en el presente estudio como en el realizado por el autor mencionado.

La α_2 -antiplasmina y el plasminógeno se sintetizan en el mismo sitio del hepatocito y tienen vida media semejante, por lo tanto es lógico suponer que el

descenso de la síntesis los afecte en forma similar (como ocurre en pacientes con daño hepático donde la disminución de ambas proteínas correlacionan). Si el descenso en los niveles de Plg se debiera a un aumento de la activación a plasmina, también deberían descender los niveles de α_2 -antiplasmina, ya que ambos se depuran en forma conjunta con la formación del complejo plasmina - α_2 -antiplasmina (PAP) (los pacientes con hiperfibrinólisis primaria tienen aumentados los niveles de PAP y disminuidos los de α_2 -antiplasmina).

Otra alternativa para explicar el descenso de los niveles de plasminógeno es la degradación de esta proteína, probablemente por la acción de las enzimas leucocitarias. Esta hipótesis está sustentada por diversos hechos: a) el plasminógeno es degradado in vitro por la elastasa leucocitaria, extracto de enzimas leucocitarias y polimorfonucleares (Resultados Parte II.2., II.3 y II.4) b) el plasma de los pacientes sépticos presenta altos niveles de complejo elastasa - α_1 -antitripsina (Resultados Parte I.) c) el 33% de los pacientes sépticos presentaron en el plasma fragmentos de degradación del Plg similares a los obtenidos in vitro (Resultados II.5). Uno de los fragmentos detectados por la técnica de SDS-PAGE/Western blot correspondía a miniplasminogeno. La ausencia de fragmentos proteicos en el 67% de los pacientes sépticos podría deberse a que los fragmentos fueran depurados rápidamente por el sistema retículo endotelial o bien que fueran clivados hasta fragmentos no reconocibles por los antiseros utilizados (situación similar, se presenta in vitro cuando se incubaba plasminógeno con elastasa, extracto leucocitario o polimorfonucleares degranulados por más de doce horas).

Entre los fragmentos obtenidos in vitro, por acción de la elastasa leucocitaria, se encuentra el miniplasminógeno, un fragmento activable por uroquinasa y estreptoquinasa a miniplasmina, una proteasa con actividad amidolítica frente a sustratos sintéticos de plasmina.

Los resultados de los ensayos realizados in vitro muestran que el miniplasminógeno es activado en presencia de fibrina por rt-PA menos

eficientemente que el plasminógeno; el sistema rt-PA/miniplasminógeno es incapaz de lisar totalmente un coágulo formado a partir de un plasma libre de plasminógeno (Resultados Parte III.5 y III.6).

Es decir que los pacientes sépticos tendrían niveles disminuidos de Plg, por degradación proteolítica generando numerosos fragmentos, entre ellos el miniplasminógeno, que tiene actividad fibrinolítica disminuida.

El estado hipofibrinolítico de los pacientes sépticos, debido como ya dijimos a los bajos niveles de plasminógeno, está aún mas acentuado por la presencia de altos niveles de PAI-1.

El aumento de los niveles de PAI-1 podría ser el resultado de un aumento en la velocidad de síntesis, debido a que se trata de una proteína reactante de fase aguda y por lo tanto ser la consecuencia, y no la causa, del estado general del paciente; los pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva también presentaron altos niveles de PAI-1.

La complejidad de los mecanismos implicados en la respuesta sistémica inflamatoria hace difícil encontrar marcadores plasmáticos útiles para predecir la sobrevida del paciente. Se han sugerido diversos marcadores basados en cambios en la concentración plasmática de los componentes de los sistemas de coagulación o fibrinólisis, de los niveles de citoquinas, del factor de necrosis tumoral o marcadores de degranulación neutrófila.

Los estudios por regresión logística de los pacientes sépticos han demostrado que la probabilidad de sobrevida puede expresarse en función de los niveles plasmáticos de plasminógeno, como así también de la relación plasminógeno/ α_2 -antiplasmina, ésta última permite descartar aquellos pacientes con daño hepático. Para un punto de corte correspondiente a niveles de plasminógeno del 65% la sensibilidad fue de 90,5% y la especificidad de 66,7%; para el punto de corte de la relación Plg/APL 0,65 la sensibilidad fue de 95,2% y la especificidad de 70,8% (Resultados Parte I.6). La persistencia de niveles disminuidos de plasminógeno

durante varios días sugieren al médico que el paciente no responde a la terapéutica aplicada.

La diversidad de los marcadores plasmáticos obtenidos en los distintos trabajos, señala la necesidad de realizar un estudio multicéntrico con un mayor número de pacientes y con protocolos bien establecidos.

Por lo expuesto anteriormente esta tesis demuestra que los pacientes sépticos presentan un estado fibrinolítico principalmente por un descenso de los niveles de plasminógeno. El descenso de los niveles de plasminógeno sería un signo más de los que aparecen en el síndrome de proteólisis inespecífica, causado por la liberación de proteasas leucocitarias. Si bien se encontró un descenso de los niveles plasmáticos de plasminógeno en diversos estudios realizados en pacientes sépticos y Seitz postuló la degradación de este zimógeno por la elastasa leucocitaria, este trabajo detecta por primera vez la presencia de miniplasminógeno en el plasma de pacientes sépticos.

Bibliografía

1. Astrup T. Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis. Vol 3. Davidson JF, Rowan RM, Samama MM, Desnoyers PC, eds. Raven Press, New York. 1978.
2. Collen D, Lijnen HR. Basic and Clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 73: 3114
3. Scheiderman J, Lokustoff DJ. Plasminogen activator inhibitor. *Trends Cardiovasc. Med.* 1991; 1: 98.
4. Kruithof EKO. Plasminogen activator inhibitor type 1: Biochemical, biological and Clinical aspects. *Fibrinolysis* 2 1988; suppl 2: 59.
5. Dastre, A. Fibrinolyse dans le sang. *Arch Norm Pathol* 1893; 5: 661.
6. Astrup T. Fibrinolysis in the organism. *Blood* 1956; 11:781.
7. Tagnon HD, Davidson CS, Taylor FHL. The coagulation defect in hemophilia: a comparison of the proteolytic activity of chloroform preparations of hemophilic and normal plasma. *J. Clin. Invest.* 1943; 22:127.
8. MacFarlane RG, Biggs R. Fibrinolysis: its mechanism and significance. *Blood* 1948; 3:1167.
9. Vasalli JD, Sappino JD, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system *J. Clin. Invest.* 1991; 88:1067.
10. Andrew M, Brooker L, Leaker M, Paes B, Weitz J. Fibrin clot lysis by thrombolytic agents is impaired in newborns due to a low plasminogen concentration. *Thromb. Haemost.* 1992; 68:325.
11. Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam S, MacCall F, Mitchel R, Davidson JF. Plasminogen levels in healthy volunteers. Influence of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Thromb. Haemost.* 1992; 68:506.
12. Takada A, Takada Y and Urano T. The physiological aspects of Fibrinolysis. *Thromb. Res.* 1994; 76(1): 1.
13. Schroder J, Gallinore MJ, Essenhaues T, Isemer FE, Scholl G, Warneke, Briggerman M, Scheler F. Parameters of the Kallikrein-Kinin, coagulations and fibrinolytic system as early indicators of Kidney transplant rejections. *Nephron* 1988; 48:183
14. Sanchez Avalos JC, Kordich L, Korin J. Fisiología de la Coagulación y la Fibrinólisis. En *Trombosis en Cardiología*. Carli A, Giuliani R, Szwarczer. Ed Atlante, Buenos Aires 1989.

15. Gallimore MJ, Aosen AO, Erichsen NS, Laterbasten Lijngars K, Amudsen E. Plasminogen concentrations and functional activator and concentration of plasmin inhibitors in plasma samples from normal subjects and patients with septic shock. *Thomb. Res.* 1980; 18: 608.
16. Biland L, Duckert F, Presender S, Nymon D. Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasminogen. *Thomb. Haemost.* 1978; 39: 646.
17. Kordich LC, Portiere P, Lago O et al. Mini-Plasminogen like molecule in septic patients. *Thromb. Res.* 1987; 47: 553.
18. Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zazdel M, Petersen TE, Magnusson S. The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine structure of human plasminogen (MW 38000) by elastase catalysed specific limited proteolysis. In *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*. Davidson JF, Rowan RM, Samama MM, Desnayes PC; eds. New York: Raven Press, 1978: 191-209.
19. Castellino FJ, Siefiring GE Jr, Sadetz IM, Bretthauer RK. Aminoterminal aminoacid sequences and carbohydrate of the two mayor forms of rabbit plasminogen. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1973; 53: 845.
20. Forsgren M, Roden B, Israelson M, Larsson K, Hedden LD. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett* 1987; 213: 254.
21. Pettersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen; a key proenzyme in the fibrinolytic system *J.Biol. Chem.* 1990; 265: 6104.
22. Ponting CP, Marschale JM, Cederholm, Williams SA. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1992; 3: 605.
23. Park CH, Tulinsky A. Three-dimensional structure of the Kringle sequence; structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 1986; 25: 3977.
24. Miles LA and Plow E. Lp(a): An Interpole into Fibrinolytic System *Thromb. Haemost.* 1990; 63(3): 331.
25. de Vos AM, Ultsch MH, Kelley RF et al. Crystal structure of the Kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator at 2,4 Å resolution *Biochemistry* 1992; 31: 270.
26. Thewes T, Constantine K, Bycon IJL, Llinas M. Ligand interactions with the Kringle 5 domain of plasminogen. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 3906.

27. Wu HL, Chang BI, Wu DH et al. Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation.
J. Biol. Chem. 1990; 265: 4249.
28. Wiman B, Lijnen HR, Collen D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α 2-antiplasmin and in fibrinogen.
Biochemistry Acta 1979; 142.
29. Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen.
J. Biol. Chem. 1980; 255: 10214.
30. Nakamura T, Nishizawa T, Haguja M et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.
Nature 1989; 342: 440.
31. Wiman B, Wallen P. Activation of human plasminogen by an insoluble derivate of urokinase.
Eur J. Biochem. 1973; 36: 25.
32. Bachman F. Fibrinolysis.
Tromb. Haemost. 1989; 227.
33. Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C. Purification and characterization of a novel, oligomeric plasminogen K4 binding protein from human plasma: tetranectin.
Eur. J. Biochem 1986; 156: 327.
34. Silverstein RL, Nochmon RL. Thrombospondin plasminogen interactions: Modulation of plasmin generation.
Semin. Thromb. Hemostas. 1987; 13: 335.
35. De Poli P, Bacon-Baguley T, Kandra-Franazok S, Cederholm MT, Walz DA. Thrombospondin interaction with plasminogen. Evidence for binding to a specific region of the Kringle structure of plasminogen.
Blood 1989; 73: 976.
36. Lijnen HR and Collen D. Fibrinolytic Agents: Mechanisms of activity and Pharmacology.
Thromb. Haemost. 1995; 74(1): 387.
37. Jespersen J, Gram J, Bach E. A sequential study of plasma histidine-rich glicoprotein and plasminogen in patients with acute myocardial infarction and deep vein thrombosis.
Thomb. Haemost. 1984; 51: 99.
38. Plow E, Felez J and Miles L. Cellular Regulation of Fibrinolysis.
Thromb. Haemost. 1991; 66(1): 32.
39. Collen D. and Lijnen R. Molecular and cellular basis of fibrinolysis. In Hematologyc basis principles and practice.
Ed. Hoffman R, Benz Jr E, Sandford S, Furie B and Cohen H. Editorial Churchill Livingstone, Ira edición. 1991.

40. Smith GF, Sundbaon JL. Heparin and protease inhibitor 1. Heparin complexes with thrombin, plasmin and trypsin.
Thromb. Res. 1981; 22: 103.
41. Bauer PI, Pozgay M, Machovich R, Elodi P, Hovoth I. The interaction of heparin with human plasmin.
Int. J. Biochem. 1983; 15: 871.
42. Smith GF, Sundboon JR. Heparin and protease inhibition.
Thromb. Res. 1981; 22: 103.
43. Bachman F. Fibrinolysis. In: Thrombosis and Haemostasis.
Vershaete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnaut J eds. Leuven University Press. Leuven 1987: 227.
44. Moyer M. Biochemical and biological aspects of the plasminogen system.
Clin. Biochem 1990; 23: 197.
45. Kolev K, Istran L, Tenekyiev K and Machovich R. Regulation of Fibrinolytic activity of Neutrophil Leukocyte Elastase, Plasmin and Miniplasmin by plasma protease Inhibitors.
J. Biol. Chem. 1994; 269(5):17030.
46. Marder VJ, Schulman NR and Carroll WR. High Molecular Weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. Physicochemical and Immunological Characterization.
J. Biol. Chem. 1969; 244: 2111.
47. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and trombolysis.
Blood 1991; 78: 3114.
48. Siebenlist KR, Meh DA, Well, JS, Hainfeld JF and Mosesson MW. Orientation of the carboxy-terminal regions of fibrin γ -chain dimers determined from the crosslinked products formed in mixtures of fibrin, dimer D and factor XIIIa.
49. Lorand L. Fibrinolytic: the fibrin-stabilizing factor system of blood plasma.
Ann. NY Acad. Sci. 1972; 202:6.
50. Laurent TC. An early look at macromolecular crowding.
Biophys Chem. 1995; 57: 7.
51. Blombäck B and Okada M. Fibrin gel structure and clotting time.
Thromb. Res. 1982; 25: 51.
52. Okada M, Blombäck B and Block M. Effect of Albumin and dextran on fibrin gel structure.
Thomb. Haemost. 1983; 50: 613 (Abs).
53. Blombäck B. Fibrinogen and Fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis.
Thromb. Res. 1996; 83 (1): 1.

54. Shah GA, Nair CH, Dhall DP. Comparison of fibrin networks in plasma and fibrinogen solution. *Throm. Res.* 1987; 45: 257.
55. Carmeliet P, Collen D. Gene targeting and gene transfer studies of the biological role of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* 1995; 74(1): 429.
56. Blasi F, Vassalli JD, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor and inhibitors. *J. Cell. Biol.* 1987; 104: 801.
57. Vassalli JD. The urokinase Receptor. *Fibrinolysis.* 1994; 8(1): 172.
58. Kluft C, Doayewaard G, Emeis JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Sem. Thromb. Hemost.* 1987; 13: 50.
59. Rijken DC, Wijngaards G and Welbergen J. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim. Biophys Acta* 1979; 580: 140.
60. Rijken DC, Hoylaerts M. and Collen D. Fibrinolytic Properties of One-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) Plasminogen Activator. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 2920 -.
61. Wallen P, Ramby M, Bergsdorf N and Kok P. Purification of porcine and human tissue activator. *Thromb. Hemostas.* 1979; 42: 414 (abs).
62. Binder RR, Spragg J and Austen KF. Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *J. Biol. Chem.* 1979; 254: 1998 .
63. Stalder M, Havert J, Kruihoff EKO, Bachman F. Release of vascular plasminogen activator after venous stasis. *Br. J. Haematol.* 1985; 61: 169 .
64. Orden G, Blombäck M. Determination of tissue plasminogen activator in plasma samples means of radioimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1984; 44: 495 .
65. Holvoet P, Cleemput H, Collen D. Assay of human tissue type plasminogen activator (t-PA) with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies to t-PA. *Thromb. Hemost.* 1985; 54: 684 .
66. Szymanski LM, Russell RP.. Fibrinolytic response to moderate intensity exercise. Comparison of physically active and inactive men. *Atherosclerosis and Thromb.* 1994; 11: 1746 .

67. Jern C, Eriksson E, Tengborn L et al. Changes of plasma coagulation and fibrinolysis in response to mental stress.
Thromb. Hemost. 1989; 62: 767 .
68. Kjaeldgaard A, Kjaeldgaard M. In vitro stimulation of plasminogen activator release from vein walls by adrenaline.
Amer. J. Clin. Pathol. 1986; 39: 1241 .
69. Folkan L, Gari M, Boonel M, Fontcuberta J. The release of plasminogen activators (t-PA, u-PA) and plasminogen activator inhibitor after venous stasis.
Blood Coagul. Fibrinolysis 1992; 3: 33
70. Fears R. Development of anisoylated plasminogen streptokinase activator complex from the acyenzyme concept.
Semin. Thromb. Hemost. 1989; 15: 129.
71. Jespersen J, Petersen KR, Skouby SO. Effects of newer oral contraceptives on the inhibition of coagulation and fibrinolysis in relation to dosage and type of steroid.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1990; 163: 396.
72. Kluff C, Prestan FE, Malia RG et al. Stonozol-induced changes in fibrinolysis and coagulation in healthy adults.
Thromb. Haemost. 1984; 51: 157 .
73. Manucci PM, Rota L. Plasminogen activator response after DDAVP: A clinico-pharmacological study.
Thromb. Res. 1980; 20: 69 .
74. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Horkins RN, Vehar Ga, Ward CA, Bennet WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Collen D. Cloning and expression of human tissue type plasminogen activator cDNA in E coli.
Nature 1983; 201: 214 .
75. Hojjar KA and Hamel NM. Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase.
J. Biol. Chem. 1990; 265: 2908 .
76. Verall S, Seeds NW. Characterization of ¹²⁵I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons.
J. Cell Biol. 1989; 109: 265 .
77. Bochman F. Laboratory Diagnosis of Impairment of Fibrinolysis in Patients with thromboembolic Disease.
Sem. Thromb. Hemost 1990; vol 16 Nro 2: 193 .
78. Wiman B, Hamsten A. Impaired fibrinolysis working party. Blood collection and handling procedures for assessment of tissue-type plasminogen activator and plasmina.
Progr. Cardiovasc. Dis. 1991; 34: 179 .
79. Hoylaerts M, Rijken D, Lijnen H and Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by Human Tissue Plasminogen activator. Role of fibrin.
J. Biol. Chem. 1982; 257 (b): 2912 -.

80. Nieuwenhurzen W, Voskuilen M, Vermand A et al. The influence of fibrin (ogen) fragments on the kinetics parameters of the tissue-type plasminogen-activator mediated activation of different forms of plasminogen.
Eur. J. Biochem. 1988; 174:.
81. Van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H. Autonomous functions of structural domains on human tissue-type plasminogen activator.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83: 4670 .
82. de Vries C, Veerman H, Pannekoek H. Identification of the domains of tissue-type plasminogen activator involved in the augmented binding to fibrin after limited digestion with plasmin.
J. Biol. Chem. 1989; 264: 12604 .
83. Barlow GH, Lager L. Characterization of the plasminogen activator isolated from human embryo kidney cells: Comparison with urokinase.
Thromb. Res. 1972; 1: 201 -.
84. Carpen O, Sakselo O, Sakselo E. Identification and localization of urokinase-type plasminogen activator in human NK-cells.
Int. J. Cancer 1986; 38: 355 .
85. Wilson EL, Jacolis P, Dowdle EB. The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro.
Blood 1983; 61: 568 .
86. Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator.
J. Biol. Chem. 1986; 261: 17120 .
87. Barlow GH, Larger L. Characterization of the plasminogen activator isolated from human embryokidney cells. Comparison with urokinase.
Thromb. Res. 1972; 1: 201 .
88. Gross JL, Moscatelli D, Jaffe EA, Rifkin DB. Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells.
J. Cell Biol. 1982; 95: 974 .
89. Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55000 for of the human plasminogen activator urokinase.
J. Cell Biol. 1985; 100: 86 .
90. Ossowski L, Biegel D, Reich E. Mammary plasminogen activator: Correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue.
Cell 1979; 16: 929 .
91. Vers Traete. The fibrinolytic system from Petri dishes to Genetic Engineering.
Thomb. Haemost. 1995; 74 (1): 25.

92. Nielsen LS, Hansen JG, Skriver L, Wilson EL, Kaltof K, Zeuthren J, Dano K. Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cell by affinity chromatography with monoclonal antibodies.
Biochemistry 1982; 24: 6410 .
93. Lijnen HR, Stassen JM, Vanlinthout I et al. Comparative fibrinolytic properties of staphylokinase and streptokinase in animal models of venous thrombosis.
Thromb. Haemost. 1991; 66: 468 .
94. Blasi F. Surface receptors for urokinase plasminogen activator.
Fibrinolysis 1988; 2: 73 - 84.
95. Lucas MA, Straight DL, Fretlo LJ, McKee PA. Effects of fibrinogen and its cleavage products on the kinetic plasminogen activation by urokinase and subsequent plasmin activity.
J. Biol. Chem. 1983; 258: 12171 .
96. Collen D, Van der Werff F. Coronary arterial thrombolysis with low dose synergistic combination of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) and recombinant single chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) for acute myocardial infarction .
Am. J. Cardiol. 1987; 60: 431 .
97. White WF, Barlow GH, Mozen MM. The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine.
Biochemistry 1966; 5: 2160 .
98. Van der Werf F, Bergman SR, Fax KAA, De Geest H, Mayng CF, Sobel BE, Collen D. Coronary Thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by rDNA technology.
Circulation 1984; 69: 605 .
99. Collen D, Stassen JM, De Cock F. Synergistic effect of thrombolysis of sequential infusion of tissue-type plasminogen activator (t-PA), scu-PA and urokinase in the rabbit jugular vein thrombosis model.
Thomb. Haemost. 1987; 58: 943 .
100. Collen D, Lijnen HR. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potencial.
Blood 1994; 84: 680.
101. Collen D, Wiman B. Turn over of antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor of plasma .
Blood 1979; 53: 313.
102. Holmes WE, Nelles L, Lijnen HR, Collen D. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin).
J. Biol. Chem 1982; 262: 1659.
103. Aoki N, Harpel PC. Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system.
Semin. Thromb. Hemost. 1984; 10: 24.
104. Hekman C, Loskutoff D. Endothelial cells produce a latent inhibitor of Plasminogen activators that can be activated by denaturants.
J. Biol. Chem. 1985; 260: 11581 .

105. Christensen U, Chemmensen I. Purification and reaction mechanism of the primary inhibitor of plasmin from human plasma.
Biochem. J. 1978; 175: 635 .
106. Loskutoff D, Sowdey M, Mimuro J. Type I plasminogen activator inhibitor.
Progr. Hemostas. Thromb. 1988; 9: 87 .
107. Kruihof EKO. Plasminogen activator inhibitor Type1: Biochemical, biological and clinical aspects.
Fibrinolysis 1988; 2 (2):59 .
108. Sprengers DE, Kluft C. Plasminogen activators inhibitors.
Blood 1987; 190: 381 .
109. Deng G, Royle G, Seiffert D and Lorkutoff DJ. The PAI-1/Vitronectin Interaction: two cats in the bag?
Thomb. Haemost. 1995; 74 (1): 66.
110. Kruihoff EKO, Trang-Thang C, Bachman F. The fast acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator inhibitor in plasma by stonozolol.
Thromb. Haemost. 1984; 51: 396 .
111. Wiman B. Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) in plasma. Its role in thrombotic disease.
Thomb. Haemost. 1995; 74 (1): 71.
112. Lindahl TL, Ohlsson PI, Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator .
Biochem. J. 1990; 265: 109 .
113. Van Hunsbergh VW, Koonstra T, VanderBerg EA, Princen HM, Fiers W, Emeis JJ. Tumor necrosis factor increases production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vitro and in rats in vivo.
Blood 1988; 72: 1467 .
114. Colucci M, Paramo JA, Collen D. Generation in plasma of a fast acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation .
J. Clin. Invest. 1985; 75: 818 .
115. Hesselvik J, Blombäck M, Biodin B, Maleer R. Coagulation, fibrinolysis and kallikreins systems in sepsis: Relation to outcome.
Critical Care Medicine 1989; 17(8): 724 .
116. Bergonzelli G and Kruihoff EKO. Induction of plasminogen activator Inhibitor 1 Byosynthesis by Hyperthermia.
Journal of Celular Physiology 1991; 148: 306 .
117. Davison SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Hemrey AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the respond differently to interleukin-1 in Hep62 cells.
J. Biol. Chem. 1993; 268: 10739 .

118. Hoffman JJML, Fears R, Bommer JJRM et al. Significance of antibodies to streptokinase or APSAC.
Fibrinolysis 1988; 2: 203 .
119. Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma.
J. Biol. Chem. 1988; 263: 15454.
120. Ye RD, Win TC, Sadler JE. cDNA cloning and expression in Escherichia coli of a plasminogen activator inhibitor from human placenta.
J. Biol. Chem. 1987; 262: 3718 .
121. Kumoar S, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2.
J. Biol. Chem. 1991; 266: 20960 .
122. Heeb Mj, España F, Gerger 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 .
123. Gerger M, Huber K, Wajta J, Stinge L, España F, Griffin JH, Binder BR. Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo.
Blood 1989; 74: 722 .
124. Wiman B, Haegerstrand-Bjorkman M, Perge S. Enzymatic Properties of t-PA/ α_2 -macroglobulin Complexes.
Fibrinolysis 1991; 5: 181 .
125. Wiman B, Collen D. On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin .
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1971; 138: 277 .
126. Scott RW, Baker JB. Protease Nexin Properties and a modified procedure.
J. Biol. Chem, 1985; 260: 7029
127. Ichinase A, Minuro J, Korde T, Aoki N. Histidine rich glycoprotein and α_2 -plasmin inhibitor in inhibitions of plasminogen binding to fibrin.
Thomb. Res. 1984; 33: 401 .
128. Leung LLK, Harpel PC, Nachman RI, Rubellino EM. Histidine rich glycoprotein is present in human platelets and is release upon thrombin stimulation.
Blood 1983; 62: 1016
129. Hadewijch LM, Pekelharing A, Henne A, et al. Effect of lipoprotein (a) and LDL on plasminogen binding to extracellular matrix and matrix dependent plasminogen activation by tissue plasminogen activator.
Thomb. Haemost. 1996; 75 (3): 497 .
130. Hervis L, Chapman MJ, Thillet J, Loyau S, Angles-Cano E. Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein (a) effects on fibrinolysis?
Blood 1993; 82: 392 .

131. delberg JM, Pizzo SV. Lipoprotein (a): the link between impaired fibrinolysis and rtherosclerosis.
Fibrinolysis 1991; 5: 135 .
132. Edelberg JM, Ganzdez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibition of plasminogen ctivation by tissue-type plasminogen activator.
Thromb. Res. 1990; 57: 155 .
133. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein (a), fibrin binding, and plasminogen activation.
Arteriosclerosis 1990; 10: 240 .
134. Aznar J, Estelles A, Bruto M, España F, Alos T. Euglobulin clot lysis induced by tissue-type plasminogen activator is reduced in subjects with increased levels of lipoprotein (a).
Thromb. Res. 1992; 66: 569 .
135. Bas Leerink C, Duiff PFCC, Gimbel JA et al. Lysine binding heterogeneity of Lip(a): Consequences for fibrin binding and inhibition of plasminogen activation.
Thromb. Haemost. 1992; 68: 185 .
136. Angeles Conu E, Herno L, Thillet J et al. Lipoprotein (a) inhibition of fibrinolysis is related to apolipoprotein (a) isoform.
Circulation 1992 (Abst); 86 (Supl 1): 4.
137. Silverstein RL, Leing LLK, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelets thrombospondin with plasminogem. Modulation of activation by tissue activator.
J. Clin. Invest. 1984; 74: 1625.
138. Silverstein RL, Lawrence LLK, Harpel PC, Nachman RL. Platelet thrombospondin forms a trimolecular complex with plasminogen and histidine-rich-glycoprotein.
J. Clin. Invest. 1985; 75: 2065.
139. Lowler J. The structural and functional properties of thrombospondin.
J. Am. Soc. Hemat. 1986; 67: 1197 .
140. Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Koizumi F. Endothelin modulation of tissue-plasminogen activator release from human vascular endothelium cells in culture.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1992; 3: 5 .
141. Furie B, Furie B. The molecular basis of blood coagulation. In hematology basic principles and practice.
Ed. Churchill Livingstone NY. 1993.
142. Dorie E. Biochemical and Molecular aspects of the Coagulation Cascade.
Thromb. Haemost. 1995; 74(1):1.
143. Bronze G and Gailani D. The Role of Factor XI in Coagulation.
Thromb. Haemost. 1993; 70 (1): 72.

144. Camp P and Esmon C. Regulatory Mechanisms in Hemostasis: Natural Anticoagulants. In Hematology Basic Principles and Practice. Ed. Churchill Livingstone NY. 1993.
145. Shimotori T and Sakurogawa N. Comparative Studies of Heparin Cofactor Activity towards ATIII and HCII, and ATIII affinity between low molecular weight heparin and unfractionated heparin. Semin. Thromb. and Haemost. 1990; 16 (suppl): 71 (r).
146. Tollefsen D. Insight into the mechanism of action of heparin Cofactor II. Thromb. and Haemost. 1995; 74 (5): 1209.
147. Dahlback. Protein C anticoagulant system: Intrented deffect as basis for venous thrombosis. Thromb. Res. 1995; 72: 1(r)
148. Sandest P. Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) an update. Haemostasis 1996; 16 (suppl 4): 154.
149. Bachman F. Do we need better thombolytics?. Vessels 1995; 1: 4 14.
150. Gurewich V, Pannell R, Lowe S. Effective and fibrin especific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase) a study in vitro and in two animal species. J. Clin. Invest. 1984; 73: 1731 .
151. Liv J, Harpel PC, Pannell R, Gurewich V. Lipoprotein (a): A kinetic study of its influence on fibrin-dependent plasminogen activation by prourokinase or tissue plasminogen activator. Biochemistry 1993; 32: 9694 .
152. Lijnen HR, Collen D. Congenital and acured deficiencies of components of the fibrinolytic system and their relation to bleeding or thrombosis. Fibrinolysis 1989; 3: 67.
153. Mussoni L, Mannucci L, Sirtoni M, Comera M, Moderna P, Sironi L, Tremoli . Hipertriglyceridemia and regulation of fibrinolytic activity. Arterioscler. Thromb. 1992; 12: 19 .
154. Aoki N, Moroi N, Sakata I Yoshira N. Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. J. Clin. Invest. 1978; 61: 1186
155. Lijnen HR, van Hoef B, De Cock F, Collen D. The mechanism of plasminogen activation and fibrin dissolution by single chain urokinase type plasminogen activator in a plasma millicu in vitro. Blood 1989; 73: 1864 .
156. Molinas F, Kordich L, Porterie P, Lerer G and Maiztegui J. Plasminogen abnormalities in patients with argentine hemorrhagic fever. Thromb. Res. 1987; 48: 713.

157. Aznar J, Estelles A, Villa V et al. Inherited fibrinolytic disorder due to an enhanced plasminogen activator level.
Thromb. Haemost. 1984; 52: 196.
158. Kruihoff EKO, Gudinchet A, Bachmann F. Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various diseases states.
Thromb. Haemost. 1988; 59: 7.
159. Booth NA, Bennet B, Wijngaards G, Grieve JHK. A new life-long hemorrhagic disorder due to excess plasminogen activator.
Blood 1983; 61: 267.
160. Vassalli JD, Sappino JD, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system.
J. Clin. Invest. 1991; 88: 1067.
161. Jackson CL, Reidy MA. The role of plasminogen activation in smooth muscle cell migration after arterial injury.
Ann. NY Acad. Sci. 1992; 667: 141.
162. Herbert JM, Lamarche I, Prabonnaud V, Dol F, Gouthier T. Tissue-type plasminogen activator is a potent mutagen for human aortic smooth muscle cells.
J. Biol. Chem. 1994; 269: 3076-3080.
163. Dano K, Andreasen PA, Grondhal-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer.
Adv. Cancer. Res. 1985; 44: 139.
164. Duffy MJ. Plasminogen activators and cancer.
Blood Coagulation Fibrinolysis 1991; 1: 681.
165. Aznar J. The plasminogen/plasmin system.
Ed. Springer-Verlog Iberica. Barcelona. 1991.
166. Bergonzelli G. Cellular Regulation of the fibrinolytic system.
Tesis Doctoral. Universidad de Lausanne. 1992.
167. Kwaan HC, Keer HN. Fibrinolysis and Cancer.
Semin. Thromb. Hemost. 1990; 16: 230.
168. Ossowski L. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: The role of cell surface-bound urokinase.
J. Cell. Biol. 1988; 107: 2431.
169. Hamsten A and Eriksson P. Fibrinolysis and Atherosclerosis: an update.
Fibrinolysis 1994; 8(1): 253.
170. Juhan-Vogue I, Collen D. On the role of coagulation and fibrinolysis in atherosclerosis.
Ann. Epidemiol. 1992; 2: 427.
171. Athens J. Granulocytes neutrophils. (Cap 9). In Wintrobe's Clinical Hematology.
Ed. Liu R, Bithel T, Foester J, Athens J and Lukens N. Lea & Febiger NY. 1993.

172. Lopez Bonasca A. Biología y Patología de la hemostasia. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Ed. Universidad de Salamanca, España. 1992.
173. Bainton DF, Farquhar MG. Difference in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. J. Cell. Biol. 1968; 39: 299.
174. Baggiolini M. The neutrophil. In the Cell Biology of Inflammation. Ed. G Weisman. NY. Elsevier. North Holland. 1980.
175. Bainton DF, Farquhar MG. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. J. Cell. Biol. 1966; 28: 277.
176. Fittschen C and Henson P. Selective Secretion of Azurophil Granule Contents Induced by Monovalent Cation ionophores in Human Neutrophils. Journal of Leuk. Biol. 1991; 50: 517.
177. Dinarello CA, Walff SM. Pathogenesis of fever in man. N. England. J. Med. 1978; 298:.
178. Boxer LA, Morgamoth ML. Neutrophil functions disorders. Disease a Month 1987; 33: 683.
179. Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, Hwang JK. How do serine proteases really work ? Biochemistry 1989; 28: 3629.
180. Smolen JE, Weissman G. The secretion of lisosomal enzymes from human neutrophils: The first event in stimulus secretion couplim. Ed. Callaham JW Lowden JA. Raven Press. New York. 1981; 31.
181. Ahens J. Variation of leukocyte in disease (Cap.60). In Wintrobe's Clinical Hematology. Ed. Liu R, Bithele T, Foester J, Athens J and Likens N. Ed. Lea & Febiger NY. 1993.
182. Selak MA, Chignard M, Smith JB. Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. Biochem J. 1988; 251: 293.
183. Selak, MA, Smith JB. Cathepsin G binding to human platelets. Evidence for a specific receptor. Biochem. J. 1990; 266: 55.
184. Hoidal J, Rao NV and Gray B. Myeloblastin: Leukocyte Proteinasa 3 in Proteolytic Enzymes. Serine and Cysteine peptidase. Ed. Banett A. Methods in Enzymology 1994; 244: 61.
185. Pastor MC, Coraminas A y Tonalba A. Elastasa: alguos aspectos de interés diagnóstico. Ed. Merck Barcelona, 1985.
186. Cannel R, Jeppsson JO et al. Structure and variation of human α_1 -antitrypsin Nature 1982; Vol 298: 329.

187. Plow EF. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potencial mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway.
J. Clin. Invest. 1982; 69: 564.
188. Egbring R, Haneman K. Possible role of polimorphonuclear granulocyte protease in blood coagulation. In neutral proteases in human polimorphonuclear leukocytes.
Ed. Haneman R, Janoff A. Urban and Schawarzenberg. Alemania 1978; 442.
189. Kordich LC, Sasseti B, Lago O. Modificación en los factores de coagulación y antitrombina III por acción de enzimas leucocitarias.
Medicina 1978; 38(6): 840.
190. Varadi K, Marossy K, Assboth G, Elodi P and, Elodi S. Inactivation of human factor VIII by granulocytes proteases.
Thromb. Haemostas. 1980; 1(76): 45.
191. Sasseti B. Acción de serinoproteasas leucocitarias aisladas de leucemias agudas sobre antitrombina III humana purificada.
Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, 1983.
192. Jochum M, Lander S, Heinburger N and Fritz H. Effect of human Granulocytic Elastase on Isolated Human Antithrombin III.
Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem. 1981; 362: 103.
193. Egbring R, Schmidt W, Fuchs G, Haveman K. Demonstration of granulocyte proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects.
Blood 1977; 49: 219.
194. Kordich L. Hemostasia en leucemias agudas no tratadas.
Tesis Doctoral de la Universidad de Bs.As., 1982.
195. Gramse M, Egbring R and Haveman K. α_2 Plasmin Inhibitor. Inactivation by Human Granulocyte Elastase.
Physiol. Chem. 1984; 365: 20.
196. Fittschen C, Sandhaus RA, Worthen GW and Henson PM. Bacterial lipopolysacharids enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils.
J. Leuk. Biol. 1988; 43: 547.
197. Gransmo ET, Halvorsen S, Godal HG et al. Impaired clot lysis in the presence of human neutrophil elastase.
Thromb. Res. 1995; 80(2): 153.
198. Adams SA, Kelly SL, Kirsch RE, Robson SC and Shephard EG. Role of neutrophil membrane proteases in fibrin degradation.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1995; 6: 693.
199. Moroz L. Miniplasminogen: A mechanism for leukocyte Modulation of Plasminogen activation by urokinase.
Blood 1981; 58: 97.

200. Reilly M, Holmgren L, Shing Y et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.
Cell 1994; 79: 315.
201. Powell J and Castellino F. Activation of Human Neo plasminogen Val₄₄₂ by urokinase and streptokinase and a kinetic characterization of Neo plasmin Val₄₄₂.
J. Biol. Chem. 1980; 11: 5329.
202. Suenson E and Petersen L. Fibrin and plasminogen structures essential to stimulation of plasmin formation by tissue-type plasminogen activator.
Biochem et Biophysica Acta 1986; 870: 510.
203. Christensen U, Sottrup Jensen L, Magnusson S, Petersen T and Clemmsen I. Enzymatic properties of the neoplasmin Val₄₄₂ (Miniplasmin).
Biochem. et Biophys. Acta 1979; 567: 472.
204. Kolev K, Kamorowicz E and Machovich J. Heparin modulation of the fibrinolytic activity of plasmin, miniplasmin and neutrophil leukocyte elastase in the presence of plasma protease inhibitors.
Blood Coagulations and Fibrinolysis 1994; 5: 905.
205. Jaffe E. Endothelial Cell Structure and function in Hematology basic principles and practise. Hoffman R, Benz E, Sandford J, Shaltil BF, Cohen H. Ed. hurchill Livingstone 1991 (1stEd.).
206. Baeseley JE, Pearson JD, Hutchings A et al. Granulocyte migration through endothelium in culture.
J. Cell. Sci. 1979; 38: 237.
207. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME et al. Interlukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of PMN.
J. Clin. Invest. 1985; 76: 2003.
208. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.
Science 1989; 243: 1160.
209. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK et al. Induction by IL-1 and Interferon gamma: tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).
J. Immunol. 1986; 137: 245.
210. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells.
J. Cell. Biol. 1988; 107: 321.
211. ACCP/SCCM consensus conference. Definitions for sepsis an organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.
CHEST 1992; 101(6): 1644.

212. algado A, Boveda JL, Monasterio J, Segura RM, Mourelle M, Gomez-Jimenez J and Percaula R. Inflammatory Mediators and their influence on Haemostasis. *Haemostasis* 1994; 24: 132.
213. Bone R. The pathogenesis of sepsis. *Ann. of Int. Med.* 1991; 115(6): 457.
214. Ten Cate JW. Citoquinas y trombosis. Conferencia en II Congreso Argentina de Hemostasia y Trombosis. Mar del Plata 21 al 23 Nov. 1996.
215. Egbring R, Seitz R, Lerch L. Interaction of granulocyte and coagulation proteases in septicaemia. *Clin. Chem. and Enz. Meetings-Jerusalem* 1995.
216. Seitz R, Walf M, Egbring KP et al. Participations and interactions of neutrophil elastase in hemostatic disorders of patients with severe infections. *Eur. J. Haematol.* 1987; 38: 231.
217. Seitz R, Walf M, Egbring R and Heverman K. The disturbance of hemostasis in septic shock: role of neutrophil elastase and thrombin. Effects of antithrombin III and plasma substitution. *Eur. J. Haematol.* 1989; 43: 22.
218. Hesselvik F, Blombäck M, Bradin B and Maller R. Coagulation, fibrinolysis and kalikrein system in sepsis: Relation to outcome. *Crit. Care Med.* 1989; 17(8): 724.
219. Doderhoff A, Bon V, Hilly G et al. Patterns of cytokines, plasma endotoxin, plasminogen activator inhibitor and acute phase proteins during the treatment of severe sepsis in human. *Crit. Care Med.* 1990; Vol 20(2): 185.
220. Philippé J, Offner F, De Clerck PJ, Leroux Roels G, Vogelaers D and Collen D. Fibrinolysis and Coagulation in Patients with infection disease and sepsis. *Thromb. Haemost.* 1991; 65(3): 291.
221. Philippé J, Doorjewaard G, Offner F, Turion P, Baele G and Leroux Roels G. Granulocyte Elastase, Tumor Necrosis Factor α and Urokinase levels as Pragnostic Markers in Severe Infection. *Thromb. Haemost.* 1992; 68(1): 19.
222. Lorente J, García Frade LJ, Landen L et al. Time Course of Hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *CHEST* 1993; 103(5): 1536.
223. Massignon D, Lepape A, Bienvenue J, Barbier Y, Boileau C, Coen P. Coagulation/Fibrinolysis Balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis* 1994; 24: 36.
224. Mester RM, Fcorke N, Osterman H, Ruenat J. Increase of plasminogen activators inhibitors levels predicts outcome of leukocytopenic patients with sepsis. *Thromb. Haemost.* 1996; 75(6) 902.

225. Montaser A, Robbi LA, Adey G and Bemrett B. Inhibitors of plasminogen activators in Neutrophils and Monuclear Cells from Septic Patients.
Thromb and Haemost 1995; 74(6): 1528.
226. Knaus WA, Draper EA, Wagner DF et al. APACHE II: A severity of disease classification system.
Crit. Care Med. 1985; 13: 818.
227. Recomendación aprobada sobre teoría de los valores de referencia.
Act. Bioquím. Clin. Latinoam; 1988; XXII (3) 443.
228. Quick AJ. Hemorrhagic Diseases.
Ed. Lear and Fabiger, Philadelphia 1957.
229. Bell WN and Anson HG. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test.
Nature 1954; 889: 883.
230. Practor R and Rapaport S. The partial thromboplastin time with kaolin.
J. Clin. Path. 1961, 36: 212.
231. Manual de Hemostasia y trombosis. Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis. Ed. Kordich L, Sanchez Avalos JC, Vidal H y De Campos Guerra. 2ª Ed. Buenos Aires, 1990.
232. Destaing F, Duzer AA, Fenand B, Portier. Dosage du fibrinogene par la micro-methode de coagulation de von A Clauss.
Pathol Biol 1960; 8(17): 1616.
233. Odegard OR, Lie M, Abidgaard U. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.
Thromb. Res. 1975; 6: 287.
234. Esmon CT, Esmon NL. Protein C activation.
Semin. Thromb. Hemost. 1984; 10(2): 122.
235. Mannucci PM, Vigano S. Deficiency of protein C and inhibitor of blood coagulation.
Lancet 1982; 2: 463
236. Amiral J, Grosley M, Boyer-Neuman C. et al.
Blood Coagulation Fibrinolysis 1994; 5: 179.
237. Abidgaard U and Larse M. Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in human plasma.
Thromb. Res. 1984; 35: 257.
238. Soria J, Soria C, Samama M. Dosage du plasminogene a l'aide de 'un substrat Chromogène tripeptidique.
Pathol Biol (Paris) 1976; 10: 725.

239. Naito K, Aokin N. Assay of α_2 -plasmin inhibitor activity by means of a plasmin specific tripeptide substrate.
Thromb. Res. 1978; 12: 1147.
240. Verheijen JH, Mullaart E, Chang GTG, Kluft C, Winjgaards G. A simple spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurement in plasma.
Thromb. Haemost. 1982; 118: 266.
241. Laurell CM. Quantitative Estimation of Proteins by electrophoresis in agarose containing antibodies.
Anal. Bioch. 1966; 15: 42.
242. Dupouy D, Sie P, Boneu B. A simple method to measure dermatan sulphate at sub-microgram concentrations in plasma.
Thromb. Haemost. 1988; 60(2): 236.
243. Statgraphics STSCINC, 1987
244. Aycaguer A. Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud.
Ed. Díaz de Santos. España 1995
245. BMDP Statistical software. Versión 1992
246. Deutsch DG and Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography.
Science 1970; 170: 1095.
247. Mancini G, Carbonara A y Herems JF. Immunochemical Quantification of Antigen by Single Immunodiffusion.
Immuno Chemistry 1965; 2: 235.
248. Lowry O, Rosenbrough N, Fan A, Randal R, Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951; 193: 265
249. Laemmli U, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 1970; 227
250. Riggett P, Isoelectric focusing: principles and methods
Ed. Pharmacia Fine Chemical 1980;
251. Krams J et al L pyroglutamyl-L propyl-L Valin p nitroanilide: A highly specific substrate for granulocyte elastase
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 1983; 43: 427
252. Malliori PA and Travis J. Elastase sterolytic activity
Biochem. 1975; 14722
253. Tobwin H, Stochelim T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to a nitrocelulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979; 76: 4350

254. Baugh R and Travis J. Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization.
Biochem. 1976; 15 (4): 836
255. Chonarin I. Laboratory Haematology. An account of laboratory techniques
Ed. Churchill Livingstone NY 1989
256. Machovich R and Owen W The elastase mediated pathway of fibrinolysis
Blood Coag. and Fibrin. 1990; 1: 79
257. Osterut B A global view on the role in monocytes and platelets in atherogenesis
Throm. Res. 1997; 85 (1): 1-22

Abreviaturas

ABREVIATURAS

α_2 -APL: α_2 -antiplasmina

α_2 M: α_2 - macroglobulina

α_1 PI: α_1 -inhibidor de proteinasa

ATIII: antitrombina III

DS: dermatán sulfato

dct-PA: activador tisular del plasminógeno doble cadena.

ELAM-1: molécula de adhesión leucocito-endotelio

HCII: cofactor II de la heparina

HFG: factor de crecimiento del hepatocito

HRG: glicoproteína rica en histidina

ICAM-1: molécula de adhesión leucocito-endotelio

IL: interleuquinas

K: kringle

LBS: sitios de unión a lisina

Lp(a): lipoproteína a

MiniPlm: miniplasmina

MiniPlg: miniplasminógeno

PA: activadores de plasminógeno

PAI: inhibidores de los activadores del plasminógeno

PC: proteína C

PGE₂: prostaglandina E dos

Plg: plasminógeno

Plm: plasmina

PMN: polimorfonuclear

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

PS: proteína S

rt-PA: activador tisular del plasminógeno recombinante

sct-PA: activador tisular del plasminógeno de una sola cadena

scu-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa de una sola cadena

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SK: estreptoquinasa

TAT: complejo trombina-antitrombina III

TFPI: inhibidor del camino del factor tisular

t-PA: activador tisular del plasminógeno

VCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares

Difusión de los Resultados

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON ARBITRAJE

1-Cofactor II de la heparina: Valores de referencia. Consumo en presencia de distintos Glicosaminoglicanos.

Duboscq C, Quintana I, Rossi e y Kordich L.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol XXIX Nro 4, 1995.

2-Plasminogen: An important hemostatic parameters in septic patients.

Duboscq C, Quintana I, Bassilotta E, Bergonzelli G, Porterie P, Sassetti B, Haedo a Waiinztein N, Kruithoff W and Kordich L.

Thrombosis and Haemostasis, July 1997.

3-Impaired clot lysis by rt-PA catalized miniplasminogen activation.

Duboscq C, Genoud V and Kordich L.

Enviado a Trombosis Research Dic 1996.

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS Y RESUMENES PUBLICADOS EN REVISTAS DE PUBLICACION PERIODICA.

1-Fibrinolisis y Sepsis.

Kordich L, Bergonzelli G, Duboscq C, Porterie P, Bassilota E, Waistein N y Kruithoff E

XXXVI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina Nov 1991.

Publicado en Medicina (#) Vol Supl, 1991 (Res nro 221).

2-Miniplasminogen in septic patients.

Sassetti B, Quintana I, Duboscq C y Kordich L.

XIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Nueva York, Estados Unidos, Jul 1993.

Publicado en Thrombosis and Haemostasis (#) 69(3), 1993 (Res nro 2614).

3-Presencia de miniplasminógeno en pacientes sépticos.

Duboscq C, Quintana I, Sassetti B y Kordich L.

XXXVIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica Mar del Plata, Argentina, Nov 1993.

Publicado en Medicina (#) Vol 53, Supl 2, 1993. Res 149.

Presentación Personal (relato)

4- Estudio del sistema fibrinolítico plasmático en pacientes septicos.

Kordich Lucia, Bassilota Ethel, Porterie P, Duiboscq Cristina, Sassetti Beatriz, Quintana Irene, Bergonzelli Gabriela, Wainstein N y Kuithrohff .

Primer Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis.

Mar del Plata, Argentina, Oct 1994.

Presentación personal (relato). Premio al mejor trabajo en fibrinolisis del congreso

5- Cofactor II de la heparina: Valores de Referencia de la Ciudad de Buenos Aires.

Actividad en suero: Acción potenciadora del Dermatán Sulfato y Dextrán Sulfato.

Duboscq Cristina, Quintana Irene y Rossi Eleonora

Primer Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis.

Mar del Plata, Argentina Oct 1994.

6-Actividad de Cofactor II de la Heparina y Concentración de Dermátán sulfato en pacientes sépticos.

Duboscq Cristina, Rossi Eleonora, Quintana Irene y Kordich Lucia.

XXXIX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica

Mar del Plata, Argentina , Nov de 1994.

Publicado en Medicina (#) Vol 54 Supl 5/2, 1994 (Res nro 80).

Presentación personal (relato)

7- Activación in vitro del miniplasminógeno por t-PA recombinante.

Duboscq C, Genoud V, Parborel F y Kordich L.

XL Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica

Mar del Plata, Argentina , Nov de 1995.

Publicado en Medicina Vol 55 Nro 5/2, 1995. (Res Nro 51).

Presentación personal (relato).

8- Activación del miniplasminógeno por t-PA recombinante.

Duboscq C, Genoud V, Parborel F y Kordich L.

XIV Congreso Internacional del Grupo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis. Punta del Este , Uruguay , Nov 1995.

Publicado en la Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia Vol III Supl 3 1995. (Res Nro 60)

Presentación personal (poster)

9-Proteolysis of plasminogen by polymorphonuclear leukocyte.

Duboscq C, Genoud V and Kordich L.

XIIIth International Congress of Fibrinolysis and Thrombolysis.

Barcelona, Jun 1996.

Publicado en Fibrinolysis Vol 10 (Suple 3) 1996 (Res Nro 221)