

N° 83
261



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ SISTEMA FIBRINOLITICO ”

TRABAJO ESCRITO

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

HORTENCIA C. LEON MOLLINEDO



México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I INTRODUCCION

II GENERALIDADES

1.- Mecanismo vascular

1.1) Estructura

1.2) Funciones

1.3) Acción

2.- Mecanismo celular

2.1) Estructura

2.2) Funciones

2.3) Acción

3.- Mecanismo humoral

3.1) Componentes

3.2) Propiedades

3.3) Vías de activación

4.- Mecanismo fibrinolítico

4.1) Componentes

4.1.1) Plasminógeno

4.1.2) Plasmina

4.2) Vías de activación del plasminógeno

4.2.1) Activación intrínseca

4.2.2) Activación extrínseca

4.2.3) Activación exógena

4.3) Inhibidores de la plasmina

4.3.1) α_2 - antiplasmina

4.3.2) α_2 -macroglobulina

4.4) Antiactivadores (inhibidores de los activadores del plasminógeno IAPs)

4.4.1) Inhibidores de la activación intrínseca del plasminógeno

- 4.4.2) Inhibidores de la activación extrínseca del plasminógeno
- 4.4.3) Inhibidores de la activación exógena del plasminógeno
- 4.5) Regulación y control de fibrinólisis
- 4.6) Mecanismos de fibrinólisis fisiológica

III PATOLOGIAS

- 1.- Coagulación intravascular diseminada (CID)
 - 1.1) Trastornos asociados a CID
 - 1.2) Consecuencias clínicas de CID
 - 1.3) Patogenia
 - 1.4) Fisiología
 - 1.5) Diagnóstico de laboratorio
- 2.- Fibrinogenólisis primaria
 - 2.1) Diagnóstico diferencial de CID con fibrinogenólisis - primaria

IV METODOS DE LABORATORIO

- 1.- Lisis de euglobulinas
- 2.- Sulfato de protamina
- 3.- Gelación de etanol
- 4.- Prueba de aglutinación de látex (para los productos de - degradación de la fibrina y fibrinógeno)

V TRATAMIENTO

BIBLIOGRAFIA

I INTRODUCCION

El término hemostasia comprende un conjunto de mecanismos fisiológicos tendientes a mantener la integridad vascular, evitando extravasaciones sanguíneas y en caso de lesión, activar el fenómeno de coagulación. En este proceso, se ven involucrados una serie de eventos que intervienen en forma simultánea e interrelacionándose unos con otros. Para fines didácticos son clasificados como: Mecanismo vascular, Mecanismo celular, Mecanismo humoral y Mecanismo fibrinolítico. En la figura (1) se representa la relación de estos mecanismos.

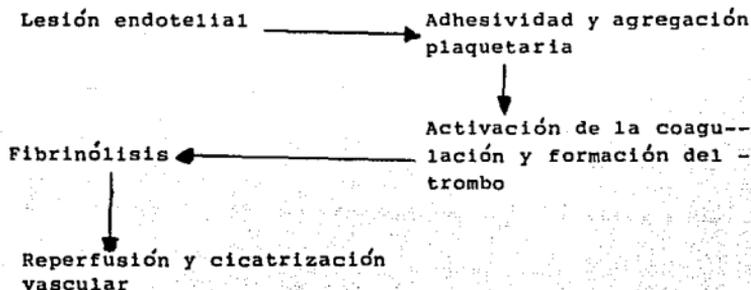


Figura (1) Dinámica de formación y lisis de un trombo (15)

La respuesta fisiológica típica a una lesión vascular es iniciada por la adherencia de plaquetas a los sitios subendoteliales, seguida por una secundaria agregación y formación del tapón plaquetario. Las plaquetas activadas originan las reacciones en cadena de las proteínas de la coagulación que llevan a la formación de trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina (14).

El sistema fibrinolítico elimina los depósitos indeseables de fibrina para restablecer el flujo en los vasos ocluidos por un trombo y para facilitar el proceso de curación que sigue a la inflamación y al daño. Es un sistema enzimático de componentes múltiples constituido por un zimógeno circulante, activadores, cofactores e inhibidores (16).

La forma inactiva de la plasmina se conoce como plasminógeno, el cual es una glucoproteína con un peso molecular de 90,000 - y tiene una vida media alrededor de dos días; su concentración en plasma es de 10 a 20 mg/dl (18).

El plasminógeno es convertido a plasmina por hidrólisis en su cadena correspondiente a Arg560-Val561; esto ocurre debido a la presencia de activadores (3). Las vías de activación del plasminógeno pueden ser: Intrínseca, Extrínseca y Exógena.

La plasmina formada se convierte en una proteasa serica activa con una especificidad mucho mayor que la trombina. Hidroliza no solo los enlaces Arg-X sino también Lis-X y puede disolver polímeros de fibrina.

Debido a que continuamente se está activando "in vivo" el mecanismo fibrinolítico debe existir una regulación por parte del organismo para que no se origine una fibrinólisis anormal o patológica que lleve a una hemorragia.

Esta regulación se efectúa por los inhibidores de la plasmina (antiplasminas) y los inhibidores de los activadores del plasminógeno (antiactivadores) (3).

Existen algunas condiciones clínicas en las cuales esta regulación es deficiente, y llega a producirse fibrinólisis patológica.

Como los demás componentes de la hemostasia, el mecanismo fibrinolítico también puede valorarse mediante pruebas de laboratorio; de las cuales las más conocidas son: lisis de euglobulinas, gelación de etanol, precipitación con protamina y determinación de los productos de degradación de la fibrina.

II GENERALIDADES

El mecanismo hemostático está diseñado para detener la hemorragia de vasos rotos ó cuya integridad se ha deteriorado. La homeostasia incluye una interacción compleja integrada por:

- 1) El vaso sanguíneo (mecanismo vascular)
- 2) Las plaquetas (mecanismo celular)
- 3) La reacción en cadena de las proteínas de la coagulación (mecanismo humoral)
- 4) Fibrinólisis (mecanismo fibrinolítico) (16).

1) Mecanismo vascular

La integridad vascular es de principal importancia, en el momento que esta se pierde, debe iniciarse la totalidad del mecanismo hemostático con el objeto de minimizar la pérdida sanguínea. En un intento por limitar esta pérdida de la integridad vascular, el cuerpo humano ha reforzado aquellos vasos que experimentan ya sea presión elevada o traumatismos frecuentes (6).

1.1) Estructura

El endotelio vascular está integrado por las siguientes capas;

- a) La íntima interna, que incluye: endotelio y subendotelio (membrana basal, tejido elástico y fibras de colágena).
- b) La media compuesta de: células de músculo liso, fibras de colágena y de fibroblastos.
- c) La adventicia externa que la constituyen: los fibroblastos y fibras de colágena (16).

1.2) Funciones

Las funciones del endotelio vascular son:

- a) Traslado de nutrientes de la sangre circulante a los tejidos circundantes.
- b) Se comporta como barrera semipermeable.
- c) Sintetiza mediadores que regulan la interacción entre la pared vascular y los componentes de la sangre (factor VIII/VWf, fibronectina, colágena, proteoglicanos).
- d) Liberación de componentes fibrinolíticos.
- e) Mediadores del proceso de reparación (migración, proliferación, trombolisis).
- f) Procesamiento de antígenos de inmunidad celular (16).

1.3) Acción

La acción del mecanismo vascular se inicia con una vasoconstricción mediada por un reflejo axonal cuya respuesta muscular es local y de corta duración, pero resulta suficiente para que disminuya el flujo sanguíneo lo cual permite que las plaquetas se orienten hacia la periferia del vaso y se alineen en lo que es conocido como flujo laminar (15).

2) Mecanismo celular

Las plaquetas son producidas a nivel medular por los megacariocitos y son liberados a la sangre periférica en forma de discos planos, cuyo diámetro es aprox. de dos micras (6).

La producción plaquetaria lleva alrededor de 9-10 días en el ser humano normal. Al igual que los vasos sanguíneos estos elementos son también necesarios para evitar la extravasación de la sangre, ya sea a través de la función hemostática propiamente dicha ó por su acción tromboplastínica.

La primera se realiza por el taponamiento mecánico en los -- vasos mencionados y la segunda por la liberación de componen-- tes gúnicos plaquetarios (18).

2.1) Estructura

Por medio del microscópio electrónico pueden identificarse -- cuatro zonas estructurales diferentes en la plaqueta, cada una relacionada con una función plaquetaria específica.

- a) Zona periférica: participa en la adherencia y el desencade-- namiento de la activación plaquetaria.
- b) Citoplasma (zona sol-gel): se relaciona con la contracción -- plaquetaria.
- c) Zona de organelos: se involucra en la secreción a través de los gránulos.
- d) Sistema de membrana: participa en el secuestro de calcio y -- la comunicación entre el interior y exterior (12).

2.2) Funciones

La cualidad peculiar de la plaqueta es su capacidad de adhe-- rirse a superficies extrañas y formar cúmulos en reacción a -- diversos estímulos que incluyen trombina, adenosinadifosfato -- (ADP) y catecolaminas (16).

Las plaquetas contribuyen a la hemostasia al formar tapones -- plaquetario y fomentar la producción de trombina. La formación del tapón plaquetario puede dividirse en ciertas fases:

a) Adhesividad

Las plaquetas se adhieren a estructuras subendoteliales ex-- puestas por la lesión; estas estructuras incluyen fibras de -- colágena y membrana basal (12).

b) Liberación

Después de adherirse a las fibras de colágena, las plaquetas expulsan el contenido de sus gránulos, en un proceso llamado -- reacción de liberación.

La reacción requiere toda la energía derivada de la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Un importante mecanismo que controla la liberación y agregación es la concentración plaquetaria de AMP cíclico, producido a partir del ATP por la adenilatociclasa y degradado por la fosfodiesterasa. La liberación se ve inhibida por sustancias que aumentan la concentración plaquetaria de AMP cíclico; estas sustancias incluyen la prostaciclina.

c) Agregación

La liberación de ADP hace que se acumulen otras plaquetas y es entonces un componente clave en la ampliación de la extensión de la agregación plaquetaria primaria, que es reversible, en tanto que las concentraciones dos o tres veces mayores producen liberación y agregación irreversible (12).

2.3) Acción

La formación del inestable tapón plaquetario da como resultado la exposición de un fosfolípido (factor 3 plaquetario) sobre la membrana de la superficie plaquetaria. Este fosfolípido (F3P) sirve como lugar de congregación para las proteínas de la coagulación. La fibrina, el producto final de la vía de la coagulación estabiliza el tapón plaquetario (6).

3) Mecanismo humoral

La teoría clásica de la coagulación establecida a principios del presente siglo por Morawitz y ampliada por Macfarlane en 1964 ha sido establecida como una cascada enzimática o reacción en cadena, ya que basta activar alguno de los factores para que actúen en forma sucesiva sobre los factores inactivos.

3.1) Componentes

El sistema humoral de la coagulación consiste en una serie de proenzimas que en estado inactivo circulan en el plasma y que se activan cuando el sistema es activado (12).

Con el objeto de evitar confusión, un comité internacional estableció una nomenclatura estándar asignando Números Romanos a las proteínas o factores de la coagulación (6).

La tabla (1) resume los factores de la coagulación y algunas de sus propiedades.

3.2) Propiedades

Con excepción del calcio, casi todos los factores de la coagulación son proteasas séricas. Las proteasas séricas se asemejan entre sí, en que todas son enzimas desdobladoras. Son diferentes entre sí en que desdoblan diferentes sustratos. Solo los factores I, V, y VIII no son enzimas desdobladoras (6).

Con respecto a sus propiedades bioquímicas están constituidas por glicoproteínas multiméricas ó monoméricas de alto peso molecular, otras sustancias involucradas como la precalicreína es una gamaglobulina monomérica y el cininógeno que es una alfa-globulina monomérica; así mismo la mayoría de los factores son sintetizados en el hígado (17).

3.3) Vías de activación

La principal función del mecanismo humoral de la coagulación es producir trombina, que estabiliza el tapón plaquetario y -- forma el coagulo de fibrina; juntos, estos fenomenos bloquean -- en forma mecánica la hemorragia de los vasos rotos (12).

Las reacciones que conducen a la formación de fibrina pueden dividirse en dos vías principales que se superponen, la intrínseca que esta mediada por una superficie de contacto y la extrínseca en la que se ve involucrada la acción de un factor tisular. La porción final de ambas es la vía común final. La figura (2) muestra estas vías de activación.

Tabla (1) Factores de la coagulación plasmática (17).

Factor	Lugar probable de síntesis	Dependencia de la vit K	Vida media activa hr	Peso Mol Estructura	Función de la forma activa
I (Fibrinógeno)	Hígado	no	70-120	340,000 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$	Proteína estructural del coágulo
II (Protrombina)	Hígado	si	70-110	72,000	Serín-proteasa
V (Proacelerina)	Hígado	no	12-36	350,000	Cofactor
VII (Proconvertina)	Hígado	si	4-6	48,000	Serín-proteasa
VIII:C(antihemofílico)	Hígado	no	10-14	150,000	Cofactor
VonWillebrand(VIIIIR)	Endotelio	no	22-40	>10,000	Cofactor de las plaquetas
IX (Christmas)	Hígado	si	8-24	57,000	Serín-proteasa
X (Stuart-Prower)	Hígado	si	24-60	59,000 D	Serín-proteasa
XI(antihemofílico C)	Hígado	no	50-80	160,000 D	Serín-proteasa
XII (Hageman)	Hígado?	no	50-60	80,000	Serín-proteasa
XIII (Estabilizante de fibrina)	Hígado	no	10-14	320,000 $\alpha_2\beta_2$	Transamidasa
Precalicroina (Fletcher)	Hígado?	no	?	85,000	Serín-proteasa
Cinínogeno de alto	Hígado?	no	?	110,000	Cofactor
PM (Fitzgerald)					

El producto final tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca es el coágulo de fibrina que se genera a partir del fibrinógeno. El fibrinógeno es una proteína dimérica con peso molecular de 340,000; cada mitad de la cual se compone de tres cadenas polipeptídicas llamada A-alfa, B-beta y gamma como se representa en la figura (3).

La trombina causa proteólisis limitada de la molécula de fibrinógeno para separar dos pequeños péptidos, los fibrinopéptidos - A y B de las cadenas A-alfa y B-beta, respectivamente; produciendo así el monómero de fibrina, como se muestra en la figura - (3) (16).

Los monómeros de fibrina se polimerizan y precipitan fuera de solución para formar el coágulo visible, la fibrina polimerizada es aún soluble en ácidos y soluciones concentradas de urea, e ineficaz en sentido hemostático.

Hay enlaces cruzados del polímero de fibrina por efecto del - factor XIII que activa la trombina, por lo que en presencia de calcio cataliza la formación de enlaces peptídicos entre grupos ácido glutámico y lisina en las moléculas adyacentes de fibrina

La sustancia que se produce es muy insoluble y eficaz en la - hemostasia (12).

4) Mecanismo fibrinolítico

El sistema fibrinolítico elimina los depósitos indeseables de fibrina para restablecer el flujo en los vasos ocluidos por un trombo y para facilitar el proceso de curación que sigue a la inflamación y al daño.(16).

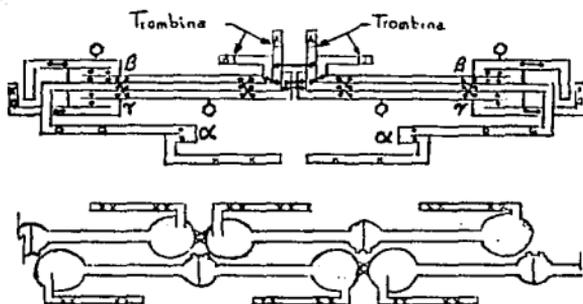


Figura (3) Estructura y polimerización del fibrin(ogeno) (16)

4.1) Componentes

Es un sistema enzimático de componentes múltiples constituido por un cinógeno circulante, activadores, cofactores e inhibidores.

La tabla (2) enumera los diversos componentes del sistema -- fibrinolítico (14).

4.1.1) Plasminógeno

El plasminógeno se encuentra abundantemente en el plasma, --- donde su concentración puede ser estimada en unos 0.1 a 0.2 --- mg/ml (10 a 20 mg por 100 ml). El plasminógeno existe también, en menores cantidades en todos los líquidos y secreciones del - cuerpo. Su nivel sube en zonas de exudación inflamatoria, don- de guarda relación con la concentración de fibrinógeno (18).

Según estudios inmunofluorescentes, se ha sugerido que el --- plasminógeno es sintetizado en los eosinófilos de la medula --- osea y luego es transportado a la circulación y a los tejidos - cuando estos lo necesitan. Otras investigaciones sospechan que la fuente primaria se halla en otra parte, posiblemente en las células endoteliales, y que el plasminógeno es transportado al eosinófilo para fines especiales pero mal definidos (18).

Propiedades fisicoquímicas: El plasminógeno humano es una --- glucoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de ----- 90,000; que contiene alrededor de 2% de carbohidratos.

La molécula de plasminógeno contiene alrededor de 790 amino-- ácidos, con 24 puentes de disulfuro y 5 estructuras homólogas - con triple vuelta como se muestra en la figura (4) (3).

Tabla (2) Componentes del sistema fibrinolítico (14).

Plasminógeno	Forma de proenzima de la enzima fibrinolítica
Plasmina	Enzima fibrinolítica activa
Activador del plasminógeno tipo tisular	Enzima presente en tejido y liberada en la sangre convierte plasminógeno a plasmina
Urocinasa	Enzima presente en orina convierte plasminógeno a plasmina
Estreptocinasa	Proteína estreptococcica que directamente activa el sistema fibrinolítico del plasma
Factor XII (Hageman), precalicreina, cininógeno de alto peso molecular	Componentes proteínicos del plasma del sistema intrínseco para convertir plasminógeno a plasmina
Antiplasminas	Moléculas que inhiben la actividad enzimática de la plasmina
α_2 -antiplasmina	Inhibidor específico rápido de plasmina en plasma humano
Antiactivadores (IAPs)	Moléculas que inhiben la actividad enzimática de los activadores del plasminógeno

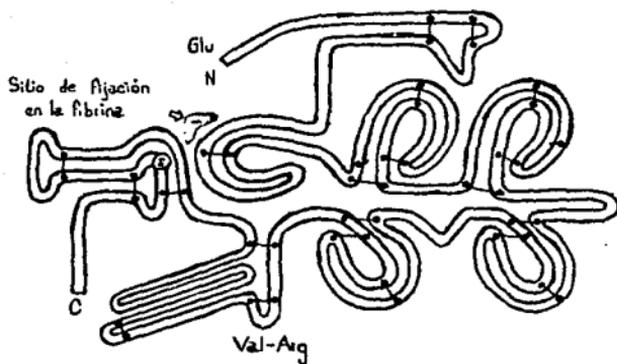


Figura (4) Estructura del plasminógeno (16).

El plasminógeno tiene en la región amino-terminal ácido glutámico ("glu-plasminógeno"), pero es fácilmente convertido por digestión plásmica limitada a la forma modificada en el amino-terminal de lisina, valina o metionina, los cuales son comúnmente designados como ("lis-plasminógeno"). Esta conversión -- ocurre por hidrólisis en la cadena peptídica de Arg67-Met68; -- Lis76-Lis77 o Lis77-Val78 (3).

Las formas de "glu-plasminógeno" y "lis-plasminógeno" pueden ser separados por cromatografía en Sephadex-DEAE. El cambio de "glu-plasminógeno" marcado con Iodo radioactivo fué estudiado en humanos normales. Mientras que "glu-plasminógeno" tuvo en plasma vida media de 2.24 ± 0.29 días, "lis-plasminógeno" -- desapareció con una vida media alrededor de 0.8 días (4).

La molécula de plasminógeno contiene en su estructura sitios llamados unión-lisina; los cuales interactúan específicamente con ciertos aminoácidos tales como: lisina, ácido 6-amino-hexanoico y ácido trans-4-amino etilciclohexano-1-carboxílico -- (3).

Estos sitios unión-lisina son localizados en la cadena A de la plasmina. El plasminógeno puede específicamente unirse a fibrina a través de sus sitios unión-lisina. Se ha encontrado en sistemas purificados y en plasma que "lis-plasminógeno" tiene una más alta afinidad para fibrina que el intacto "glu-plasminógeno" (3).

Las diferencias en unión de "glu-plasminógeno" y "lis-plasminógeno" a fibrina podía ser debido a una interacción intramolecular de uno de los sitios unión-lisina con un sitio específico en la región amino-terminal de "glu-plasminógeno" el cual ya no está presente en "lis-plasminógeno". Estos resultados indican indirectamente la importancia de los sitios unión-lisina en -- plasminógeno para la interacción con fibrina. Así se concluye que una de las funciones de los sitios unión-lisina en plasminógeno es mediar su interacción con la fibrina (3).

4.1.2) Plasmina

Las formas de "lis-plasminógeno" son convertidas a plasmina - por una ruptura en la sola cadena Arg-Val correspondiente a la Arg560-Val561. Las dos cadenas de la molécula de plasmina están compuestas de una cadena pesada ó cadena A, originada de la región amino-terminal del plasminógeno y una cadena ligera o cadena B, originada de la región carboxilo-terminal (3)

La cadena B fue encontrada que contiene un sitio activo similar al de tripsina, compuesto de un residuo de histidina. Parece que el sitio activo de plasmina esta compuesto de His602, Asp645 y Ser740 (3).

Debido a investigaciones se ha propuesto que la activación de "glu-plasminógeno" ocurre en dos pasos: liberación del grupo -- amino-terminal; preactivación del péptido principal por ruptura de Arg67-Met68 cediendo "lis-plasminógeno"; seguida por la ruptura de la Arg560-Val561 en la cadena para generar plasmina --- (3).

Propiedades fisicoquímicas: La más ligera de las dos cadenas de la plasmina tiene un peso molecular de 26,000 y contiene la estructura serina-histidina responsable de la actividad enzimática de la plasmina; la cadena más pesada tiene un peso molecular alrededor de 55,000 su concentración en plasma normal es -- cero y su vida media de 0.1 seg (17).

La plasmina tiene muchas características comunes con la tripsina; es una endopeptidasa que hidroliza los enlaces susceptibles de arginina y lisina en proteínas a un pH neutro, y actúa sobre la mayoría de las proteínas y sustratos sintéticos sensibles a la acción triptica (18).

La plasmina digiere el fibrinógeno y la fibrina a ritmo similares. La degradación de la fibrina por la plasmina se representa en la figura (5).

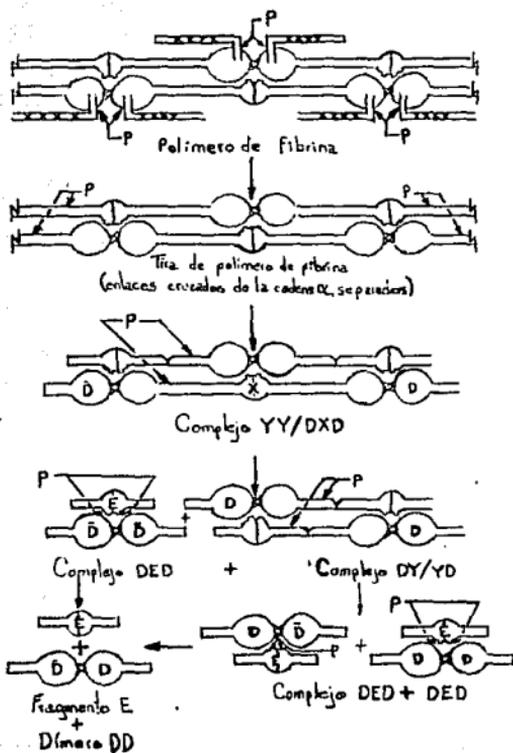


Figura (5) Degradación de la fibrina por la plasmina (16).

La digestión de un polímero de fibrina por la plasmina avanza por separación de las porciones extendidas carboxilo-terminal de las cadenas alfa para producir tiras aisladas de fibrina. Pronto, en la digestión de las tiras, se forman los complejos que corresponden a YY/DXD y DY/YD, seguidos por complejos DED más pequeños, dímeros DD y fragmentos E. Cuando el fibrinógeno es degradado por la plasmina libre, aparecen los mismos fragmentos aunque pueden permanecer intactas las cadenas A-alfa y B-beta (16).

Además del fibrinógeno y la fibrina, la plasmina hidroliza -- también un cierto número de otras proteínas, particularmente -- los factores de la coagulación plasmática V y VIII, pero incluyendo componentes del complejo sérico, la ACTH, la hormona de crecimiento y el glucagon entre otros (18).

En la tabla (3) se resumen algunas propiedades de los componentes del sistema fibrinolítico.

4.2) Vías de activación del plasminógeno

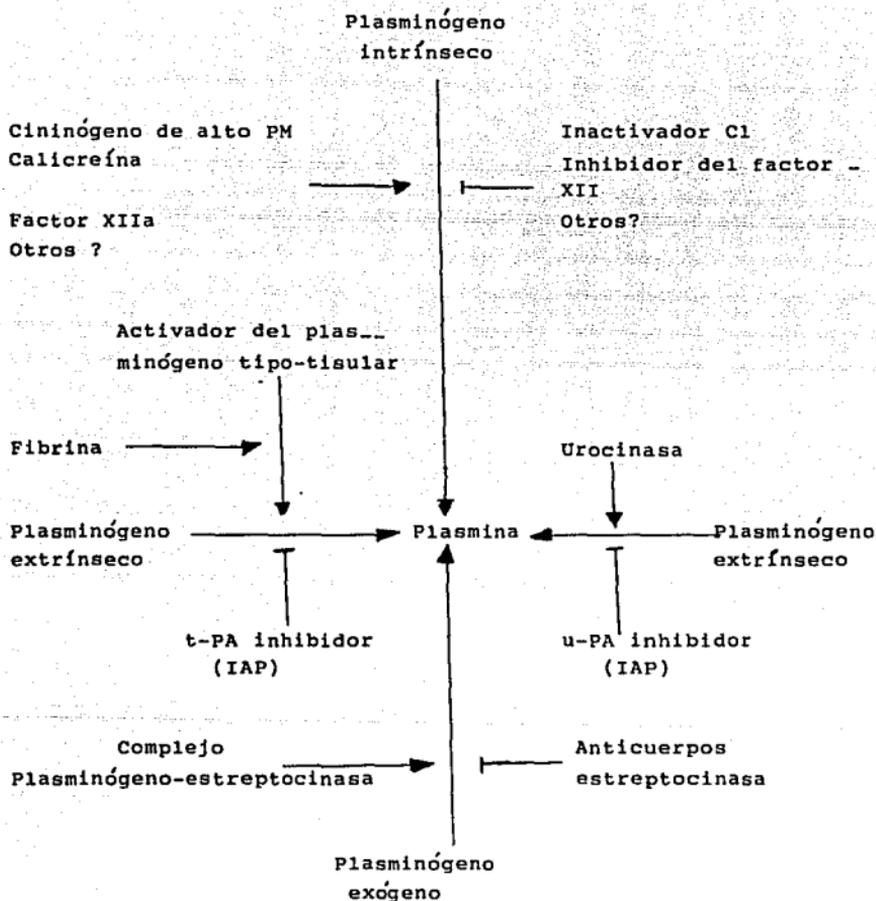
La fibrinólisis se inicia con la participación de los activadores del plasminógeno. Como se ilustra en la figura (6); la activación del plasminógeno puede ocurrir por tres diferentes vías; una vía intrínseca ó humoral en la cual todos los componentes implicados están presentes en forma de precursor en la sangre; una vía extrínseca en la cual el activador se origina en el tejido ó desde la pared vascular y es liberado a la sangre por ciertos estímulos ó traumas; y una vía exógena en la cual la activación es por la sustancia estreptocinasa. La vía intrínseca y extrínseca son las vías fisiológicas permanentes.

La exposición del sistema fibrinolítico a estreptocinasa es una activación no fisiológica (15).

Todos los activadores del plasminógeno estudiados hasta ahora ejercen su acción por hidrólisis de la Arg560-Val561 en la cadena del plasminógeno (3).

Tabla (3) Propiedades de los componentes del sistema fibrinolítico (17).

Nombre	Peso molecular	Concentración basal/plasma	Vida media en plasma	Propiedades
Plasminógeno	Cadena única 88,000 (glu)	2.4 uM (21 mg/ml)	2.2 días 0.8 días	Cinínógeno; sitios ligantes de la lisina a la fibrina en las porciones Kringler; sitio sensible al activador Arg-Val.
Plasmina	dos cadenas 85,000 (glu) 77,000 (lis) 38,000 (val)	cero	0.1 seg	Serín-proteasa sitio activo en la cadena ligera; tamaño variable de la cadena pesada que -- contiene las estructuras "Kringler".
Inhibidor α_2 de la plasmina	Cadena única 67,000	1 uM (7 mg/ml)	2.6 días	Inhíbe la lisis del fibrinógeno formado complejos 1:1 con -- la cadena ligera de la plasmina, impide la unión de la plasmina a la fibrina.
Activadores del plasminógeno; Extrínsecos				
Tisular	Una o dos cadenas 60,000 a 70,000	Indicios	15 min	Tipo vascular derivado de las células endoteliales y secretado a la sangre, alta afinidad por la fibrina.
Urocinasa	Dos cadenas 55,000 32,000	-	10 min	Serín-proteasa acción directa sobre la unión Arg-560-Val -- del plasminógeno.



Figura(6) Vías de activación del plasminógeno (La plasmina es generada por activadores intrínsecos, extrínsecos, o exógenos. La regulación ocurre vía la acción de un número de inhibidores naturales) (14).

4.2.1) Activación intrínseca

La activación intrínseca del plasminógeno puede ocurrir por una ó más vías involucrando: factor XII (factor Hageman), precalicreína (factor Fletcher), cininógeno de alto peso molecular (factor Fitzgerald), y posiblemente otros componentes.

El mecanismo exacto de esta activación; así como, su papel biológico permanece aún desconocido por lo que es difícil evaluar su importancia fisiopatológica (14).

4.2.2) Activación extrínseca

Las dos vías extrínsecas permanentes son mediados por dos --- distintos activadores del plasminógeno; tipo tisular y tipo --- urocinasa. Ambos se encuentran en el plasma y son capaces de --- generar plasmina en la vecindad de fibrina (14).

El activador tisular ha sido descrito y aislado desde muchos tejidos; así como de las paredes de los vasos, originandose -- presumiblemente en el endotelio vascular. Es rápidamente libe-- rado en la corriente sanguínea en respuesta a un número de es-- tímulos provocados tales como; oclusión venosa, ejercicio, --- shock, acidosis, ó la administración de epinefrina ó arginina que son activadores de vasoconstricción (14).

Este activador parece ser una serina-proteasa con un peso mo-- lecular alrededor de 60,000 compuesto de dos puentes de disul-- furo en la cadena polipeptídica. Una importante propiedad de -- este activador es su alta afinidad por la fibrina, lo cual ha -- sido usado para su aislamiento. El activador tisular es relati-- vamente un pobre activador del plasminógeno en sistemas puros pero la fibrina estimula notablemente la activación (3).

Por otra parte la urocinasa es una proteasa semejante a la -- tripsina aislada de orina humana ó cultivo celular de embrión -- de riñón humano. Puede tener dos formas moleculares designadas como S1 con un peso molecular de 31,600 y S2 con un peso mole-- cular de 54,000. El primero es probablemente una degradación -- proteolítica del último.

La urocinasa difiere del activador tisular del plasminógeno -- en sus características antigénicas y en su especificidad enzi-- mática, particularmente con respecto a la activación del plas-- minógeno asociado a fibrina. La urocinasa también difiere del activador tisular en que su liberación es provocada por estímulo-- los no conocidos (3) (14).

4.2.3) Activación exógena

La estreptocinasa es una proteína no enzimática con un peso -- molecular alrededor de 47,000 producida por el grupo "C" de --- Lancefield de las especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos, -- lo cual activa el sistema fibrinolítico indirectamente (15).

La estreptocinasa forma un complejo estequiométrico 1:1 con -- el plasminógeno ó plasmina y de ese modo convierte la proenzima inactiva en un eficaz activador del plasminógeno (3).

La estreptocinasa se une a la porción carboxilo-terminal del plasminógeno (ó de la plasmina) haciendo más reactivo el cen--- tro de la serina. Esto sucede sin ruptura del sitio Arg-Val de activación específica. En esta forma el complejo es capaz de -- convertir a otras moléculas de plasminógeno a plasmina como se muestra en la figura (7) (16).

El complejo tiene una constante de disociación de 5×10^{-11} M y es formado con una proporción constante de alrededor de --- 3×10^7 M⁻¹s⁻¹, lo cual indica que el complejo es estable y que es rápidamente formado (3).

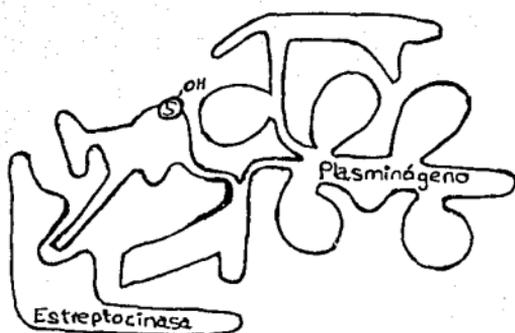


Figura (7) Activación del plasminógeno por la estreptocinasa - (16).

4.3) Inhibidores de la plasmina

Una vez concluida la acción de la plasmina, esta queda libre pudiendo actuar nuevamente en donde exista un enlace Arg-Lis -- como es en el mismo fibrinógeno (fibrinogenólisis), sobre algunos de los componentes del complemento, sobre el factor V y --- VIII, y otras proteínas. Afortunadamente existen antiplasminas que inhiben la actividad proteolítica de la plasmina (1).

4.3.1) α 2-antiplasmina

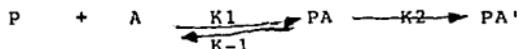
El principal compuesto, la α 2-antiplasmina es un muy rápido inhibidor y protege al plasma contra los efectos proteolíticos no muy específicos de la plasmina, cuando esta se encuentra en el plasma. Sin embargo α 2-antiplasmina es un muy ineficiente inhibidor de plasmina cuando esta se encuentra en la fibrina, - lo cual facilita la duración de la actividad fibrinolítica de - esta enzima (14).

La α 2-antiplasmina es una sola cadena de glicoproteína con un peso molecular de 70,000 que contiene alrededor de 13 % de carbohidratos, su concentración en plasma es 1 uM (7 mg/dl) y una vida media de 2.6 días (3).

α 2-antiplasmina forma un complejo muy estable estequiométricamente 1:1 con la plasmina, el cual esta libre de actividad de proteasa ó esterasa como se esquematiza en la figura (8) (3) (16).

La formación del compuesto ocurre por una fuerte interacción entre la cadena ligera (B) de la plasmina y el inhibidor.

La reacción entre plasmina y α 2-antiplasmina procede en al - menos dos pasos: una reacción muy rápida de segundo orden seguida por una más lenta reacción de primer orden irreversible y -- puede ser representada por:



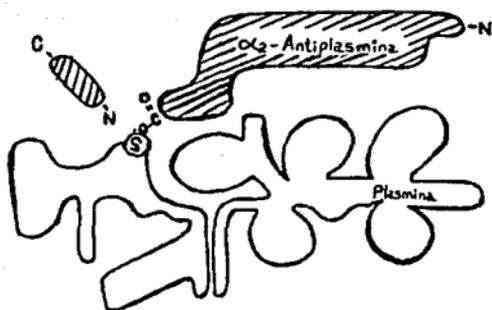


Figura (8) Inhibición de la plasmina (16).

La constante a pH 7.5 es $3.8 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ y $1.8 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ para las dos formas de plasmina. Esta constante de la reacción es una de las más rápidas hasta ahora descritas para interacciones proteína-proteína y es de orden uno, de magnitud más alta que la proporción de la reacción de tripsina con sus inhibidores.

La constante de disociación del paso reversible es alrededor de $2 \times 10^{-10} M$ y la velocidad de reacción para el segundo paso es $4 \times 10^{-3} s^{-1}$ (3) (1).

Ya formado el complejo plasmina- $\alpha 2$ -antiplasmina tiene un peso molecular de 150,000 el cual en reducción es disociado en dos partes: una intacta cadena A de plasmina (peso molecular de 60,000) y un muy estable complejo entre la cadena B de plasmina y $\alpha 2$ -antiplasmina (peso molecular de 80,000), estipulando que la formación del complejo es llevado a cabo en exceso de $\alpha 2$ -antiplasmina (3).

Recientemente se ha identificado y aislado un péptido de bajo peso molecular (alrededor de 8,000) el cual, es generado concomitantemente con la formación del complejo. Este péptido no está ligado al complejo por puentes de disulfuro puesto que puede ser detectado previo a la reducción (3).

El complejo puede ser disociado en NH_4OH 1.5 M regenerando -- arriba de 0.2 mol/mol actividad de plasmina y un inhibidor modificado con un más bajo peso molecular (60,000) que el inhibidor original (70,000). La $\alpha 2$ -antiplasmina nativa tiene en el extremo amino-terminal una secuencia de Asn-Gln-Gln-Gln-Val y en extremo carboxilo-terminal una secuencia de Phe-Leu; el inhibidor modificado tiene la misma secuencia en el extremo amino-terminal, pero en el extremo carboxilo-terminal una secuencia de Ala-Leu (3).

El péptido con un peso molecular de 8,000 y una secuencia en el extremo amino-terminal de Met-Ser-Leu-Ser Gln-Phe y la secuencia de Phe-Leu en el extremo carboxilo-terminal, sugiriendo que parte de la $\alpha 2$ -antiplasmina para originar su extremo carboxilo-terminal (3).

Estos resultados y por analogía con complejos de tripsina y sus inhibidores sugiere que el complejo estable entre plasmina y α_2 -antiplasmina es formado por un ataque plásmico a un péptido Leucil-Metionil específico unido en el extremo carboxilo-terminal del inhibidor. Probablemente un fuerte enlace covalente es formado entre el residuo Seril del sitio activo en la plasmina y el residuo Leucil específico del extremo carbonil en el inhibidor (3) (15).

También cuando la plasmina tiene ácido-6-aminohexanoico ó lisina ligados a los llamados sitios unión-lisina; ó liga sustratos a su sitio activo reacciona muy lentamente con α_2 -antiplasmina (3).

Estos resultados indican que los sitios unión-lisina y un sitio libre activo en la molécula de plasmina son de gran importancia para la proporción de su reacción con α_2 -antiplasmina; estas interacciones son probablemente de gran importancia para la regulación de fibrinólisis "in vivo" (4).

4.3.2) α_2 -macroglobulina

La α_2 -macroglobulina representa un más lento inhibidor de plasmina en el plasma y su papel parece ser inactivar plasmina formada en exceso de la capacidad inhibitoria de α_2 -antiplasmina. La plasmina formada es inicialmente ligada a α_2 -antiplasmina; hasta después de su saturación, el exceso de plasmina es neutralizada por α_2 -macroglobulina; por lo que se le considera como una segunda línea de inhibición (3).

4.4) Antiactivadores (Inhibidores de los activadores del plasminógeno IAPs)

Los activadores del plasminógeno son directamente opuestos -- por un número de inhibidores de los activadores del plasminógeno (IAPs); denominados también antiactivadores.

El principal IAP, conocido como IAP-1 normalmente circula en el plasma siendo almacenado en las plaquetas y ligado a la matriz extracelular. Otro antiactivador poco conocido es el --- IAP-2 que se encuentra presente en la placenta y neutrofilos; y liberados en la sangre durante el embarazo (9).

Para lograr la detección de estos inhibidores se han hecho ensayos de coagulación y lisis; pero estos ensayos son también sensibles a la presencia de inhibidores de plasmina lo cual -- hace difícil la identificación, así como, el nivel al cual --- actúan estos inhibidores (9).

4.4.1) Inhibidores de la activación intrínseca del plasminógeno

Se ha propuesto varios inhibidores de la activación intrínseca del plasminógeno presente en el plasma como son: inactivador C1, inhibidor del factor XIIa, complejo heparina-anti---trombina III y α 2-macroglobulina. Puesto que el papel fisiológico de la vía intrínseca fibrinolítica no está establecida, el papel de estos inhibidores en la regulación y control de fibrinólisis es enteramente especulativo (3) (4).

4.4.2) Inhibidores de la activación extrínseca del plasminógeno

La formación de un complejo reversible inhibidor del activador-activador el cual disocia en la presencia de fibrina ha sido propuesto para explicar la rápida lisis de fibrina en plasma y la resistencia del fibrinógeno a la degradación por plasmina.

Sin embargo la evidencia para la existencia de un inhibidor específico del activador tisular del plasminógeno en plasma, -- formando el complejo reversible puede a lo más ser considerado como un estudio preliminar (3) (4).

El mecanismo de inhibición de urocinasa en la sangre es poco conocido.

El inhibidor de urocinasa basados en ensayos de coagulación y lisis es fuertemente dependiente de la presencia de inhibidores de plasmina y son por eso una vía no específica.

La α 2-macroglobulina, 1-antitripsina, antitrombina III y α 2-antiplasmina inhiben urocinasa lentamente (3) (14).

4.4.3) Inhibidores de la activación exógena del plasminógeno

El plasma humano contiene anticuerpos dirigidos contra estreptocinasa, los cuales son probablemente el resultado de infecciones previas con *Streptococcus* β -hemolíticos. Puesto que es estreptocinasa es neutralizada por los anticuerpos anti-estreptocinasa como tratamiento esta debe ser suficiente para neutralizar los anticuerpos y así obtener activación fibrinolítica (3).

4.5) Regulación y control de fibrinólisis

Se ha sugerido que el sistema fibrinolítico esta en equilibrio dinámico con el sistema de coagulación siempre y cuando exista una pared vascular íntegra (3).

El hecho que el sistema fibrinolítico es continuamente activado "in vivo" esta apoyado por el descubrimiento de la actividad del activador del plasminógeno en sangre normal y a un nivel reducido en pacientes con padecimientos de trombosis (2).

Se ha observado que una deficiencia congénita de α 2-antiplasmina resulta en una tendencia al sangrado, y una parcial deficiencia de plasminógeno puede ser asociado con trombosis recurrente (1).

Otros estudios han considerado que la coagulación y el sistema lítico no son continuamente activados pero estan diseñados para ser activados "in situ" cuando se necesite para la hemostasia local (3).

Por lo tanto la regulación y control de fibrinólisis parece suceder a varios niveles: liberación del activador del plasminógeno de la pared vascular, activación del plasminógeno asociado a fibrina e inhibición de plasmina formada por α_2 -antiplasmina.

Los mecanismos que controlan la liberación del activador de plasminógeno de las células endoteliales han sido revisados recientemente, la administración parenteralmente de adrenalina extrae o libera un activador del plasminógeno; esto puede ser debido no solo a la interacción con sitios receptores adrenérgicos periféricos, presumiblemente a nivel celular endotelial, pero posiblemente también en parte a la liberación central de sustancias semejantes a las vasoconstrictoras las cuales estimulan la liberación del activador del plasminógeno. Sobre estas bases y otras evidencias se ha especulado que la liberación del activador del plasminógeno puede ser bajo control neurohumoral (3).

4.6) Mecanismos de fibrinólisis fisiológica

La enzima proteolítica plasmina tiene una amplia especificidad lo cual no es muy diferente con la tripsina; sin embargo, "in vivo" el principal blanco de la plasmina es la fibrina (7).

Se ha delineado algunos de los principales rasgos de el mecanismo de fibrinólisis: el activador esta presente en bajas concentraciones liga al inhibidor circulante en la sangre, pero es adsorbido y acumulado en la superficie de la fibrina (4).

El efecto de los inhibidores contra la activación y contra la plasmina esta reducida por la adsorción del activador y plasmina a la fibrina. La activación del plasminógeno se produce en la superficie de la fibrina, la fibrina es lisada, el activador y plasmina son liberados y ligados por sus respectivos inhibidores (13).

Otros estudios sugieren que el plasminógeno es adsorbido en la polimerización de la fibrina y convertido a la enzima activa por los activadores los cuales difunden hacia el trombo y la plasmina ejerce su acción en un ambiente relativamente libre de inhibidores (2).

También se ha propuesto que el complejo plasmina-inhibidor formado en la circulación disocia en la presencia de fibrina ya que la plasmina tiene más afinidad por la fibrina que por sus inhibidores (3).

III PATOLOGIAS

Los trastornos de la hemostasia pueden dar como resultado una hemorragia ó trombosis.

Estas patologías pueden ser de tipo hereditario o adquirido, entre los de tipo hereditario del sistema fibrinolítico se encuentran: una deficiencia de α_2 -antiplasmina; altas concentraciones del activador tisular del plasminógeno; una disfunción en los inhibidores de los activadores del plasminógeno (IAPs) - entre otros (13) (1).

Un trastorno de sangrado adquirido que involucra al sistema fibrinolítico, aunque de manera secundaria, se ha convertido en un síndrome reconocido. Se han utilizado diversos terminos para el síndrome, incluyendo coagulopatía por consumo, síndrome de desfibrinación, reacción generalizada de Schwartzman y síndrome trombohemorrágico (17). En la actualidad se utiliza más comunmente el termino de coagulación intravascular diseminada (CID).

Aunque se produce tanto la activación del sistema fibrinolítico como el de coagulación, parece que la fibrinólisis es una respuesta secundaria; esto es importante para poder diferenciar otro trastorno fibrinolítico anormal conocido como fibrinogénolisis primaria en el cual tambien hay sangrado.

1) CID

La pérdida de localización del proceso de la coagulación constituye en general, la base del proceso de coagulación intravascular diseminada. El proceso fibrinolítico también se inicia en forma difusa, pero esta no es una enfermedad fibrinolítica primaria. El defecto no se encuentra en el sistema fibrinolítico, la aceleración del sistema lítico es solo una consecuencia de la coagulación difusa (6).

Se cree que la proteólisis excesiva del fibrinógeno y fibrina por la trombina y la plasmina es la causa del trastorno (12).

1.1) Trastornos asociados a CID

Existen una diversidad de condiciones que parecen desencadenar la coagulación intravascular, no esta claro todavía si los estímulos etiológicos basicos son uno o mas tipos de lesion. A pesar que la mayoría de algunos casos, la activacion de otras enzimas parece producir el mismo resultado (17).

Los trastornos que con frecuencia coexisten con coagulación intravascular diseminada se enumeran en la tabla (4).

1.2) Consecuencias clínicas de la CID

La coagulación intravascular diseminada puede conducir a tres consecuencias clínicas bien definidas como se muestra en la figura (9).

- a) El consumo de plaquetas y factores de la coagulación mas las propiedades antihemostáticas de los productos de degradación de la fibrina abocan en potencia hacia una tendencia hemorrágica (18).
- b) Los depósitos de fibrina pueden bloquear el flujo capilar en un órgano determinado y producir un daño hístico isquémico grave. El riñon es especialmente sensible a la isquemia. Otros organos que se pueden afectar son las suprarrenales, hipófisis, pulmón, hígado, médula ósea y piel. Clínicamente el daño hístico isquémico grave despues de la cid se halla sobre todo en los trastornos pediátricos y en las complicaciones del embarazo (18).

Tabla (4) Trastornos relacionados con CID (12).

1.- Estímulo local de la coagulación

- a) Vascular: hemangioma gigante, aneurisma aórtico, trombosis masiva, embolia pulmonar.
- b) Lesión tisular: quemaduras, feto muerto retenido, desprendimiento prematuro de placenta, embolia de líquido amniótico.

2.- Estímulo generalizado de la coagulación

- a) Venenos de serpientes
- b) Choque séptico
- c) Infecciones: septicemia, viremia, tuberculosis miliar, paludismo.
- d) Anafilaxia
- e) Neoplasmas: carcinoma de próstata, páncreas, pulmón, mama, leucemia aguda.

3.- Regulación defectuosa: insuficiencia hepática, trastornos de la depuración de factores activados, síntesis defectuosa de fibrinógeno.

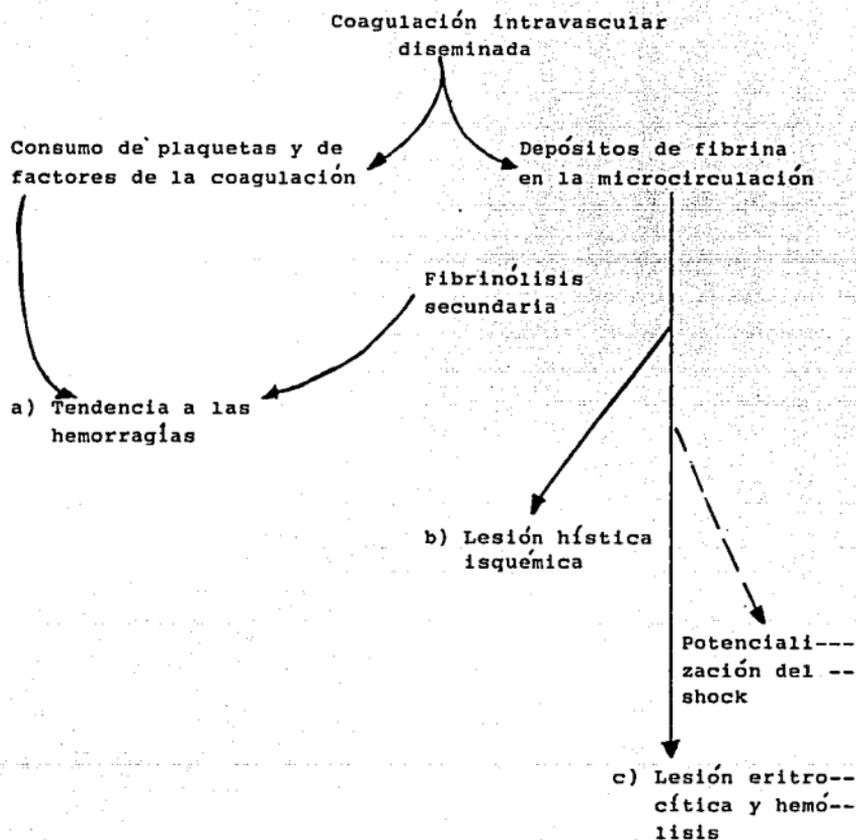


Figura (9) Mecanismos por los que la coagulación intravascular diseminada produce la enfermedad clínica.

- c) Si la fibrina se deposita en los pequeños vasos sanguíneos, en formas de hilos colgantes, la sangre todavía fluye a través de los vasos, pero los globulos rojos aparecen fragmentados porque se lesionan cuando friccionan con la fibrina. Una anemia hemolítica intensa se puede producir con hemoglobinemia, hemoglobinuria y una alteración morfológica característica de los hematíes. Los globulos rojos aparecen en forma de casco y microsferocitos en la extensión sanguínea. Este tipo de anemia hemolítica se denomina anemia hemolítica microangiopática (18).

1.3) Patogenia

Una coagulación intravascular fisiológica es probable que no ocurra de manera continua. Esto se debe, por un lado, a la --- exposición limitada de la sangre circulante a los agentes capaces de iniciar la coagulación. Otra razón es que los dispositivos celulares extraen en forma eficaz los indicios de intermediarios de la coagulación activados en la sangre especialmente cuando esta fluye a través del hígado (17).

A pesar de ello las sustancias procoagulantes se potencian -- suficientemente en casos de enfermedad, como para desencadenar la CID cuando estos factores aumentan ó penetran en el torrente sanguíneo (18).

Los estímulos procoagulantes actúan en diferentes pasos de -- las reacciones de la coagulación sanguínea para producir la -- CID:

- a) Una sustancia puede actuar como intermediaria ó paso tardío en la coagulación. Materiales que activan directamente el factor X han sido identificados en la mucina y en los ex--- tractos tumorales y pueden explicar la asociación de trombosis y coagulación intravascular con los adenocarcinomas secretores de mucina (18).

La CID después de la mordedura de serpientes venenosas es el resultado de la entrada en la circulación de un enzima proteolítica que convierte directamente el fibrinógeno en fibrina (12). Un enfermo con un aneurisma arterial puede desarrollar hipofibrinogenemia, trombocitopenia y otras alteraciones que sugieren una coagulopatía por consumo, posiblemente no relacionado con la coagulación dentro del aneurisma si no con la dispersión en la circulación de los factores de la coagulación activados y la consiguiente coagulación intravascular difusa (18).

- b) La introducción en la circulación de sustancias con actividad tromboplástica hística puede iniciar las reacciones coagulantes extrínsecas. Esto puede ocurrir con el tejido cerebral después de un traumatismo craneal, con el contenido uterino en las enfermas con complicaciones obstétricas, con granulos procedentes de promielocitos en la leucemia aguda y con tejido prostático después de la cirugía (9) (18).
- c) La sangre puede entrar en contacto con sustancias capaces de desencadenar las reacciones de la coagulación intravascular intrínseca. La lesión a pequeños vasos sanguíneos por ejemplo, en la vasculitis alérgica ó inmunológica expone posiblemente la sangre a la actividad tromboplástica hística desde las células endoteliales lesionadas y desde los leucocitos. Sin embargo, también se expone la sangre al colágeno en la membrana basal y tejido conectivo subyacente. El colágeno activa el factor XII y posiblemente, un factor en la superficie plaquetaria que puede iniciar una coagulación intrínseca independiente del factor XII. El colágeno induce también la agregación plaquetaria y hace posible la actividad del factor 3 plaquetario. Estas acciones combinadas podrían desencadenar efectivamente la coagulación intrínseca (18).

- d) Las endotoxinas de gérmenes gramnegativos pueden causar la coagulación en muchas especies animales y la endotoxemia representa una causa mayor de CID. La endotoxina podría inducir la coagulación por diversos mecanismos (14).

1.4) Fisiología

La principal proteína blanco en la CID es el fibrinógeno y -- las enzimas más importantes que atacan al fibrinógeno son la -- trombina y la plasmina. El aumento de la actividad de la trombina es primario, y el de la plasmina es una reacción a la activación de la coagulación y a la formación de fibrina.

Además de actuar sobre el fibrinógeno la trombina digiere los factores V y VIII y acumula las plaquetas; también activa una proteína que depende de la vitamina K, conocida como proteína C, y esta a su vez, inactiva los factores V y VIII. La digestión del fibrinógeno por la plasmina da lugar a la formación de un grupo de productos conocidos como productos de la degradación del fibrinógeno/fibrina. Además de degradar el fibrinógeno la plasmina digiere también los factores V y VIII (12) (17).

1.5) Diagnóstico de laboratorio

La CID produce alteraciones complejas en los factores hemostáticos mediante varios procesos: deplección de los factores hemostáticos; formación de complejos solubles de monómeros de fibrina; activación de la fibrinólisis secundaria (14).

Por lo tanto el enfermo con manifestaciones de CID muestra el siguiente patrón de laboratorio: trombocitopenia; tiempo de --- protrombina prolongado; un tiempo parcial de tromboplastina y - un tiempo de trombina prolongado debido al consumo de factores de la coagulación, y a los efectos anticoagulantes de los pro-- ductos de degradación de la fibrina; un título bajo de fibrinó-- geno, y una prueba de paracoagulación de protamina en plasma -- positiva. Además, la prueba de aglutinación de látex para los productos de degradación de la fibrina sera positiva. Son ---- tambien importantes la presencia de ezquistocitos (células en - casco de granada) en frotís de sangre periférica (16) (18).

2) Fibrinogenólisis primaria

La fibrinogenólisis primaria es una fibrinólisis anormal y -- esto se debe a un exceso de plasmina circulante y a su acción - proteolítica sobre el fibrinógeno y otras proteínas plasmati--- cas.

Normalmente no existe plasmina circulante ya que es neutrali-- zada inmediatamente por las antiplasminas. Sin embargo, exis-- ten circunstancias donde la localización de la plasmina en el sitio de la formación del coágulo no es la correcta debido a la activación masiva del plasminogeno (2) (11).

La fibrinogenólisis primaria espontánea es muy rara pero pue-- de causar hemorragías graves.

Una causa frecuente de fibrinogenólisis primaria es la ciru-- gía urológica, en especial cuando involucra a la glándula pros-- tática, puede dar como resultado la liberación de grandes can-- tidades de activadores tisulares del plasminógeno hacia la co-- rriente sanguínea.

Esto puede resultar en activación tisular masiva del plasminógeno a plasmina, superando de este modo la capacidad neutralizadora de las antiplasminas; su consecuencia es fibrinólisis anormal (2) (6).

La lisis de coágulos que taponan en forma adecuada áreas de lesión quirúrgica vascular puede tener como resultado una hemorragia incontrolable. También se produce fibrinólisis anormal luego de la administración intravenosa de estreptocinasa o de urocinasa; estos agentes se administran para lisar los coágulos que forman los embolos pulmonares (EP) y los trombos de las venas profundas (TVP) (6).

2.1] Diagnóstico diferencial de CID con fibrinogenólisis primaria

Las alteraciones típicas de la fibrinogenólisis primaria son: tiempo de protrombina y trombina prolongado; bajos niveles de fibrinógeno; los factores V y VIII descienden y hay acumulación de los productos de degradación del fibrinógeno.

En la fibrinogenólisis primaria se halla de modo claro un aumento de la actividad fibrinolítica de la sangre in vitro, -- por ejemplo una lisis rápida de euglobulinas. En la CID con fibrinólisis secundaria no se advierte el aumento de la actividad fibrinolítica in vitro. Esta y demás diferencias se exponen en la tabla (5) que sirven para poder diferenciar estas condiciones clínicas (18).

Sin embargo existe dificultad diagnóstica en enfermos que tengan ambos procesos; la CID y fibrinogenólisis primaria, por lo que es muy importante el conocimiento de los trastornos clínicos que estan asociados a estas patologías.

Tabla (5) Diferencias entre CID y fibrinogénesis primaria (18)

	CID	Fibrinogénesis primaria
Frecuencia	Relativamente común	Muy rara
Enfermedad subyacente	Presente	A menudo no existe, en ocasiones hepatopatía
Plaquetas	Bajas	Suelen ser normales
Fibrinógeno	Bajo	Bajo
Factor V	Bajo	Bajo discretamente
Factor VIII	Bajo	Normal ó lig. bajo
Prueba de paracoagulación en el plasma	Positivo	Negativo
Tiempo de lisis del coágulo	Normal ó prolongado	Rápido
Tiempo de lisis de euglobulina	Normal ó prolongado	Rápido
Fibrina	Lisis normal ó ligeramente aumentada	Lisis muy aumentada
Productos de fragmentación de fibrina en el suero	Desde ninguno hasta altas concentraciones, según el grado de lisis secundaria	Elevados niveles

IV METODOS DE LABORATORIO

Aunque la presencia de un trastorno hemorrágico puede sospecharse mediante la historia y la observación clínica, el diagnóstico exacto depende de las pruebas específicas de laboratorio.

Existen un grupo de pruebas necesarias para efectuar la valoración y detección tanto de alteraciones vasculares, celulares, humorales y fibrinolíticas.

La actividad del mecanismo fibrinolítico puede valorarse por métodos sofisticados de inmunoensayo como es el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen a un determinante antigénico en el dímero-D que resulta de la fragmentación de la fibrina; o la determinación de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (5) (13).

Sin embargo, existen otros métodos menos costosos y por lo tanto más accesibles a todos los laboratorios que son capaces de evaluar al sistema lítico; de estos métodos los más utilizados son:

- 1) Tiempo de lisis de euglobulinas
- 2) Sulfato de protamina
- 3) Gelación de etanol
- 4) Prueba de aglutinación en látex (para los productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno)

- 1) Tiempo de lisis de euglobulinas

Introducción: En la fracción euglobulina del plasma, se encuentra el fibrinógeno, el plasminógeno y las fibrinólisinas. Esta técnica suprime los inhibidores del plasminógeno.

Las fibrinólisis del eritrocito destruidas aceleran la lisis pero se encuentran en cantidades muy constantes, en cambio existe variación en la fibrinólisis plasmática. Si el paciente cursa con un componente fibrinolítico los activadores presentes en dicha reacción transformaran al plasminógeno en plasmina y esta última actuara sobre la fibrina formada.

Fundamento: La fracción euglobulina del plasma preparada por dilución y acidificación, esta relativamente libre del sistema enzimático fibrinolítico. La desaparición del coágulo va a --- significar la lisis de euglobulinas y por lo tanto es un indicio de la presencia de plasmina y/o de los activadores del plasminógeno.

Objetivo: Valorar el componente fibrinolítico

Procedimiento: Material:

Tubos de cultivo de 13X100 mm
Pipetas serológicas de 0.2, 1.0 y 5.0 ml
Aplicadores de madera, gradilla
Matraz erlemeyer de 50 ml
Papel sanitario, papel parafilm

Material biológico:

Plasma citratado pobre en plaquetas

Equipo:

Centrifuga
Baño de incubación a 37°C

Reactivos:

Acido clorhídrico 0.1 N
Amortiguador de imidazol pH 7.3
Trombina diluida (solución de trabajo 1:10)
Acido acético 1%
Cloruro de calcio 0.025 M

Técnica A:

- a) En un tubo de ensayo de 13X100 mm colocar
4.2 ml de agua destilada
0.15 ml de ácido clorhídrico
0.3 ml de plasma problema
- b) Tapar el tubo con papel parafilm y agitarlo por inversión -- suave

- c) Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos
- d) Desechar el sobrenadante
- e) Agregar 0.3 ml de amortiguador de imidazol
- f) El precipitado se resuspende con un aplicador previamente --
mojado en amortiguador de imidazol
- g) Agregar 0.1 ml de trombina diluida
- h) Agitar el tubo suavemente, taparlo con papel parafilm y co--
locarlo en baño de incubación a 37°C
- i) Observar la formación del coágulo cada 10 minutos

Técnica B:

- a) En un matraz erlemeyer de 50 ml agregar 19 ml de agua desti--
lada
- b) Adicionar 1.0 ml de plasma y 0.35 ml de ácido acético al 1%
(gota a gota y agitando)
- c) Reposar a 4°C durante 10 minutos
- d) Agitar y repartir en 4 tubos volúmenes iguales
- e) Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos
- f) Decantar el sobrenadante y secar la pared interna de los tu--
bos
- g) Redisolver con 1 ml de amortiguador de imidazol
- h) Colocar en baño de incubación a 37°C
- i) Coagular con 2 gotas de cloruro de calcio 0.025 M o 0.1 ml -
de trombina (debe coagular entre 1 minuto 45 segundos a 2 mi
nutos)
- j) Observar la lisis del coágulo en las 2 primeras horas

Valores de referencia:

El coágulo debe permanecer formado --
más de dos horas (10).

2) Sulfato de protamina

Introducción: El sulfato de protamina tiene la propiedad de inducir la polimerización no enzimática de complejos solubles de monómeros de fibrina, que se forman en el plasma cuando se encuentran trazas de trombina circulante. Tal fenómeno se denomina paracoagulación y consiste en la formación de filamentos de fibrina ó de un verdadero coágulo despues de añadir sulfato de protamina.

Fundamento: Los complejos solubles de monómeros de fibrina -- con fibrinógeno y productos de la degradación de la fibrina y -- fibrinógeno ó ambos, precipitan cuando se añade protamina al -- plasma.

Objetivo: Detectar los monómeros solubles de fibrina y/o los productos de degradación de fibrinógeno y fibrina.

Procedimiento: Material:

Tubos de cultivo de 10X75 mm
Pipetas serológicas de 0.2, 1.0 y 5.0 ml
Tubos de centrifuga de 5 ml
Papel sanitario, papel parafilm

Material biológico:

Plasma citratado pobre en plaquetas

Equipo:

Cronometro
Baño de incubacion a 37°C

Reactivos:

Solución de sulfato de protamina 1% en amortiguador

TRIS pH 6.5 0.05 M

Amortiguador TRIS pH 6.5 0.05 M

Técnica:

- a) Efectuar una dilución 1:5 de la solución de sulfato de protamina con el amortiguador TRIS
- b) Colocar 0.2 ml de esta dilución en un tubo de 10X75 mm
- c) El plasma pobre en plaquetas (ppp) del problema se obtiene al centrifugar el plasma rico en plaquetas. El ppp se coloca en un tubo limpio y se incuba a 37°C durante 5 minutos
- d) Adicionar 0.2 ml de ppp al tubo que contiene 0.2 ml de sulfato de protamina (dilución 1:5)
- e) Tapar el tubo y colocarlo a 37°C durante 30 min. agitar suavemente y observar la apariencia de la mezcla de reacción. Reportar considerando los criterios indicados en la parte de resultados.

Resultados:

g	gelación
rf	red de fibrina
+++	precipitado grueso
+	precipitado fino
-	solución clara

Si el resultado es positivo es necesario realizar diluciones del sulfato de protamina con el amortiguador TRIS en las siguientes proporciones: 1:10; 1:20; 1:40. Para cada una de estas diluciones continuar con la técnica desde el inciso (b).

Valores de referencia: Negativo solución clara

La presencia de un precipitado granular fino significa la existencia de bajos niveles de monómeros de fibrina o productos de degradación de fibrinógeno y de fibrina. Se considera positiva si los tubos presentan coágulo de fibrina o precipitado fino (10).

3) Gelación de etanol

Introducción: En algunas de las patologías de los sistemas de la coagulación como en coagulación intravascular diseminada --- (CID) ó en procesos fibrinolíticos se producen productos de degradación de la fibrina o del fibrinógeno así como monómeros de fibrina, los cuales son capaces de paracoagular en presencia de etanol.

Fundamento: En esta prueba se aprovecha la propiedad de provocar la paracoagulación que tiene el etanol sobre los complejos solubles (monómeros de fibrina ó fragmentos X° ligados a productos de degradación del fibrinógeno ó de la fibrina).

Objetivo: Observar las reacciones de paracoagulación en una muestra problema.

Procedimiento: Material:

Tubos de cultivo de 10X75 mm
Pipetas serológicas de 1.0 ml
Gradilla
Papel sanitario, papel parafilm

Material biológico:

Plasma citratado pobre en plaquetas

Equipo:

Baño de incubación a 22°C

Reactivos:

Citrato de sodio al 3.8%
Etanol al 50% en agua destilada

Técnica:

En un tubo de 10X75 mm colocar 0.5 ml de plasma pobre en plaquetas. Colocar en el baño de incubación durante 3 minutos; -- adicionar 0.15 ml de etanol al 50%, agitar suavemente el tubo y mantener en reposo durante 10 minutos a 22° C (TA), después de este tiempo observar con inclinación cuidadosa del tubo la gelificación de la muestra.

Resultados:

Gelación = positiva
No gelación = negativa

Interpretación: Dado que esta prueba es positiva para monómeros de fibrina como productos de degradación del fibrinógeno es necesario que el resultado se analice en forma integral con el resto de las pruebas de laboratorio.

Valores de referencia: No se observa gelación (10).

- 4) Prueba de aglutinación en látex (para los productos de degradación de la fibrina y fibrinógeno)

Finalidad de la prueba: La prueba detecta la presencia de -- productos de degradación de la fibrina ó del fibrinógeno en el suero y es útil en el diagnóstico de coagulación intravascular diseminada (CID) o en fibrinólisis primaria.

Principio: Los antisueros contra preparaciones altamente purificadas de fragmentos D y E de fibrinógeno humano, son adsorbidos en partículas de látex. Estos se aglutinan en presencia de productos de degradación de la fibrina o del fibrinógeno.

Reactivos:

- a) Suspensión de látex. Es una suspensión al 0.5% de partículas de látex polistireno revestidas de anticuerpos de conejo contra los productos de degradación del fibrinógeno ---- (PDF).
- b) Suero control positivo y negativo. El control positivo es plasma humano normal diluido con suero humano normal de forma que la concentración del fibrinógeno sea de 5 a 10 ug/ml. El control negativo es suero normal que contiene menos de 2 ug de PDF/ml.

- c) Tubos de recolección de muestras. Cada tubo contiene inhibidor de tripsina de soya (aprox. 3,600 NFU) y trombina bovina (20 NIHU) suficiente para la toma de 2 ml de sangre -- total ó de orina, sin embargo se puede usar con igual eficacia tubos con EDTA o con heparina.
- d) Amortiguador salina-glicina. Glicina 7.5 g, cloruro de sodio 8.5 g y azida sódica 0.1 se disuelven en 900 ml de agua El pH es ajustado a 8.2 con NaOH 0.2 N y la solución se diluye hasta obtener un litro con agua destilada. El amortiguador se conserva a la temperatura de 4°C.

Técnica:

Se coloca en un tubo de recolección de muestra 2 ml de sangre, recogidas en una jeringa por punción venosa limpia y se mezclan inmediatamente invirtiendo el tubo varias veces. La sangre se coagula en pocos segundos y luego se incuba a 37°C durante aproximadamente 30 minutos. El suero se separa por --- centrifugación. Después es diluido al 1:5 y 1:20 con amortiguador de glicina y se coloca una gota de cada dilución sobre un portaobjetos. La mezcla suero diluido/látex es agitada con una varilla y los portaobjetos se balancean suavemente de un lado a otro por espacio de 2 minutos exactamente, en tanto se observa la aglutinación macroscópica. En caso de producirse ésta se aprecia fácilmente a simple vista. Con cada prueba debe practicarse un control negativo y positivo ya conocidos.

Interpretación: El nivel serico de PDF es menos de 10 ug/ml y los reactivos se ajustan de manera que el suero con una --- concentración inferior a esta no dara aglutinación con las -- diluciones 1:5 o 1:20 de suero normal. En la CID el nivel de PDF excede de 10 ug y en los casos agudos puede exceder de -- 40 ug.

No obstante, incrementos similares pueden encontrarse en --- otros estados que implican degradación enzimática (además de - la trombina) ó no enzimática del fibrinógeno.

A veces se encuentran niveles aumentados en la trombosis de venas profundas y en el embolismo pulmonar, pero tales incre- mentos son muy transitorios (18).

V TRATAMIENTO

El tratamiento del paciente que presenta hemorragia debe seguir varios pasos. Lo primero es investigar si la hemorragia se debe a un trastorno hereditario ó adquirido; por lo que tiene mucha importancia hacer una historia clínica minuciosa y concisa ya que esto proporciona una información valiosa, además de apoyarse en un buen diagnóstico de laboratorio, para conocer que mecanismo de la hemostasia es el alterado; es decir, si el defecto se localiza en el mecanismo vascular, celular, humoral ó fibrinolítico. Esto también es fundamental ya que de aquí depende hacer una buena elección del tratamiento a seguir; porque es, diferente el tratamiento de un defecto plaquetario a una falla en el mecanismo humoral de la coagulación.

La terapia a base de productos sanguíneos se ha modificado - actualmente ya no se utiliza sangre total sino componentes de ella; y cada componente es para un tratamiento específico, y -- cada paciente sera expuesto solo a aquellos componentes que requiera (11).

El tratamiento de los trastornos de la fibrinólisis involucra primero la determinación de sí el incremento de la lisis - es secundario al incremento de la coagulación, ó si constituye el proceso primario. En la primera circunstancia, el tratamiento debe estar dirigido hacia el proceso de la coagulación mientras que la segunda, el tratamiento esta dirigido hacia - el proceso lítico (6) (13).

En el caso particular del tratamiento de pacientes con CID - existen tres pasos básicos. El primero es localizar y tratar la causa provocadora de la CID, esto será el soporte de la terapia y si se realiza en forma adecuada conducirá a la extinción de la totalidad del proceso. La no realización de este paso, ó el fracaso en encontrar la causa, hará que el tratamiento adicional resulte más dificultoso. Por ejemplo si la septicemia es una fuerte posibilidad, deberá iniciarse la terapéutica antibacteriana de inmediato, antes que los resultados confirmatorios del cultivo (9) (16).

Una vez localizada y tratada la causa provocadora de la CID y siendo la hemorragia la complicación principal de la CID, la restitución de las fracciones sanguíneas se convierte en la siguiente medida de urgencia. Sin embargo si el enfermo no esta sangrando en forma activa, ya sea en forma generalizada o de una lesión localizada, no esta indicada mayor terapéutica hemostática (6) (16).

Si el paso uno y dos fueron realizados en forma efectiva, el paso tres es casi siempre innecesario. El tercer paso involucra la posible administración de fármacos que modulen la cascada de la coagulación, la fibrinólisis ó ambos procesos.

Aqui esta incluido el controvertido uso de la heparina. Si la etiología de la CID es la presencia intravascular de fosfolípido tisular que esta activando continuamente la vía extrínseca, entonces el tratamiento que inhiba la reacción en cadena de la coagulación será el tratamiento de la causa principal ó primaria. La terapia con heparina representa dicho tratamiento, y puede ser indicada hasta el momento en que el fosfolípido tisular pueda ser eliminado del espacio intravascular (6).

Sin embargo, esta es una arma de doble filo, si bien la heparina limitará el depósito de fibrina, tal depósito puede ser necesario en el área de la lesión. Por eso mientras la detención del sistema de la reacción en cadena de la coagulación representa una forma de tratamiento generalizado, el área local de la lesión puede ser privada del beneficio del coágulo de fibrina (15).

Si la causa primaria de la CID se encuentra en el área de los trastornos de la integridad vascular o de las plaquetas, la heparina no trata dichas causas, solo modifica el proceso subsiguiente. El proceso vascular o plaquetario continuará sin control y la CID continuará pese al tratamiento con heparina (6).

La administración de heparina debe ser intravenosa continua y a un adulto se le puede dar una inyección intravenosa inicial rápida de 5,000 a 10,000 UI/hora. En pacientes con trombocitopenia grave se dan dosis más bajas por ejemplo de 100 a 200 UI/kg por día (14).

A los pacientes que reciban heparina no se les debe inyectar por vía intramuscular dado que pueden formar grandes hematomas después de las inyecciones (18).

Otro fármaco utilizado es el ácido epsilon aminocaproico (AEAC). El AEAC bloquea la formación de plasmina en el sistema fibrinolítico. El uso de AEAC produce un desequilibrio entre el esquema general de la coagulación y el de la lisis. Si la coagulación continúa, y la lisis es obstruida, el resultado puede ser una grave trombosis generalizada (8).

Si el proceso lítico fué activado por agentes como la urocinasa que puede ser debido a una cirugía urológica ó la estreptocinasa, y la coagulación no se encuentra activa, entonces el AEAC puede ser indicado; esto sucede en la fibrinogenólisis --- primaria (6)(8).

El AEAC se puede administrar por vía oral en tabletas de ---- 500 mg o bien como un jarabe que contiene 250 mg/ml. Por vía - intravenosa se administra como un vial de 20 ml que contiene -- tambien 250 mg/ml. Cuando se emplea por vía oral se administra una dosis inicial de 5 g, seguido de 1 g por hora. Cuando se - emplea por vía intravenosa, se infunde una dosis inicial de 5 g la primera hora seguida de una infusión de mantenimiento de 1 g por hora. No se debe administrar más de 30 g en un período de 24 horas (13) (14).

Alternativamente tambien puede emplearse ácido tranexámico - ya que tambien es un potente inhibidor de fibrinólisis, este - se da oralmente 1.5 g tres veces diarias (14).

Un aspecto muy importante que debe siempre señalarse y que -- tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de trastornos -- de la coagulación, se requiere contar con un excelente labora- torio de coagulación en el que se tengan incluidas no solo --- pruebas que valoren la fase celular y humoral de la coagula--- ción sino que también, se incluyan las de fibrinólisis cuya -- utilidad es muy apreciable en hospitales en los que el tipo de pacientes; ginecobstétricas, cardiópatas, hipertensos, cance-- rosos, politraumatizados entre otros; frecuentemente cursan -- con estados de hipercoagulabilidad ó ya en franca CID. Un --- diagnóstico oportuno repercutira en una mayor posibilidad de - la recuperación del paciente que es el objetivo de nuestra --- labor.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aoki N. "Genetic abnormalities of the fibrinolytic system". *Thrombosis and Hemostasis*. 10:42-50 (1984).
- 2.- Booth N.A.; B. Bennett, G. Wijngaards; J.H.K. Griene. "A new life-long hemorrhagic disorder due to excess plasminogen -- activator". *Blood*. 61: 267-275 (1983).
- 3.- Collen D. "On the regulation and control of fibrinolysis". *Thrombosis and Hemostasis* 43;77-89 (1980).
- 4.- Collen D.; H.R. Lijnen. "The fibrinolytic system in man". *Haematol* 4: 249-301 (1986).
- 5.- Elms M.J.; I.H. Bunce; P.G. Bundesen; D.B. Rylatt; A.J. Webber; P.P. Masii; A.N. Whitaker. "Measurement of crosslinked fibrin degradation products an immunoassay using monoclonal antibodies". *Thrombosis and Hemostasis*. 50: 591-594 (1983).
- 6.- Fischbach David P.; Fogdall Richard P. "Coagulacion". Ed. - panamericana (1985). Argentina.
- 7.- Holvoet P.A.; Boer; Verstreken M.; Collen D. "An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of plasmin- - antiplasmin complex in human plasma application to the detection of in vivo activation of the fibrinolytic system". *Thrombosis and Hemostasis*. 56; 124-127 (1988).
- 8.- Kang Y.; J.H. Lewis; Navalgund A.; Russell M.W.; Bontempo F.A.; Nirew L.S.; Starzl T.R. "Epsilon aminocaproic acid for treatment of fibrinolysis during liver transplantation". *Anesthesiology* 66; 766-773 (1987).
- 9.- Kruithof E.K.O.; Tran-Thang C.; Gudinchet A.; Hauert J.; Nicoloso G.; Genton C.; Welt H.; Bachmann F. "Fibrinolysis in pregnancy: A study of plasminogen activator inhibitors". *Blood*. 69: 460-466 (1987).
- 10.- Manual de practicas de laboratorio de hematologia. Facultad de quimica UNAM, (1989) Mexico.
- 11.- Miles L.A.; Plow E.F.; Donnelly K.J.; Hougie C.; Griffin J.H. "A bleeding disorde due to deficiency of -antiplasmina". *Blood*. 59: 1246-1251 (1982).

- 12.- Rifkind Richard a.; Bank Arthur; Marks Paul A.; Karen L.; Kaplan ; Rose Ruth Ellison; John Lindenlaum. "Hematologia". 3era. edicion, Ed, interamericana (1988) , Mexico.
- 13.- Schleef R.R.; Higgins D,L.; Dillener E.; Levitt L.J. "Bleedin diathesis due to decreased funtional activity of type I plasminogen activador inhibitor". J. Clin. Invest. 83: 1747-1752 (1989).
- 14.- Stump David C.; Fletcher M.D. ; Taylor B.; Michael.E, Nasheim; Alan P.D.; R. Giles; Walter M.D.; Dzik H.; Edwin M.D.; Bovill G. "Pathologic fibrinolysis as a cause of clinical bleeding". Thrombosis and Hemostasis. 16: 260-273 (1990).
- 15.- Stump D.C.; MannK.G."Mechanisms of thrombus formation and -lysis". Ann Emerg Med. 17: 1138-1147 (1988).
- 16.- Thompson Arthur R.; Harker Laurence A. "Hemostasia y trombosis" Ed. El manual moderno. (1985)Mexico.
- 17.- Todd-Sanford."Diagnostico clinico por el laboratorio".7a. Ed. Editorial salvat (1986). Mexico.
- 18.- William J. William. "Hematologia". 3era. Edicion Mc-GRAW-Hill (1983). USA.