



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

FIBRINOLISIS EN CÁNCER DE MAMA

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

TESINA QUE REALIZA PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLINICA

PRESENTA:

Martha Cecilia Arámburu Gaitán

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Jurado asignado:

Presidente Dr. Juan R. Labardini Méndez

Vocal Dra. Sandra Nieto

Secretario Dr. Raúl Izaguirre Ávila

Primer Suplente Dr. Rogelio Paredes Aguilera

Segundo Suplente Dr. Héctor Baptista González

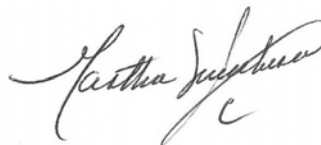
Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Cancerología en el área de Hematología.

Asesor del Tema:



Dra. Patricia Baz Gutiérrez

Sustentante:



Q.F.B. Martha Cecilia Arámburu Gaitán

Las grandes almas tienen voluntades,  
las débiles, tan solo deseos

Proverbio Chino.

Yo no estimo tesoros ni riquezas,  
y así, siempre me causa más contento  
poner riquezas en mi entendimiento  
que no mi entendimiento en las riquezas

Sor Juana Inés de la Cruz.

A mi familia:

Roberto

Gracias por brindarme la oportunidad  
y apoyarme en alcanzar esta nueva meta.

Marthita

Gracias por toda tu ayuda incondicional  
y apoyo de siempre.

Carlos y Beto

Gracias por su ayuda, consejos y bromas

Dios los bendiga a todos

A mis maestros, tutora, Jurado

Gracias por sus consejos y apoyo

Y

En memoria de la maestra Oliva

## INDICE GENERAL

Indice de Figuras	.....	VIII
Indice de Tablas	.....	X
Introducción	.....	1
Fundamento	.....	2
Objetivo	.....	3
Capitulo 1	Aspectos Fisiológicos de la Fibrinólisis	8
	1.1. Fibrinólisis	8
	1.2. Estructura y Propiedades del Plasminógeno y sus Activadores	13
	1.2.a. Plasminógeno	16
	1.2.a.1 Propiedades estructurales y funcionales de los dominios Kringles del plasminógeno	20
	1.2.b. Los activadores del plasminógeno	22
	1.2.c. Receptor para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa u-PAR	28
	1.2.c.1. La expresión de u-PAR	30
	1.2.c.2 . Aspectos funcionales de la internalización del receptor	32
	1.2.c.3. Señales de transducción generadas por u-PAR	33
	1.2.c.4. Papel de u-PAR	36
	1.2.c.5. u-PAR soluble	37
	1.3. Inhibidores serín proteasas ( SERPINs)	38
	1.3.a. PAI-1	42
	1.3.b. PAI-2	45
	1.3.c. Inhibidores de la Plasmina	50
	1.3.c.1. $\alpha$ 2-antiplasmina	50
	1.3.c.2. $\alpha$ -macroglobulina	51
	1.3.c.3. Inhibidor de C1	52
	1.4. Otros componentes del sistema fibrinolítico	52
	1.5. Funciones no proteolíticas del sistema de Activación del Plasminógeno	53
	1.5.a. La Vitronectina	54
	1.5.b. Integrinas	55

1.5.c. Interacción con moléculas de señalización .....	56
1.5.d. Familia de Receptores de Lipoproteína de baja densidad (LDRL) .....	57
1.6. Mecanismos de Activación del plasminógeno .....	58
1.6.a. Focalización de proteínas fibrinolíticas en la superficie de la fibrina o membranas celulares .....	58
1.6.a.1. El Fibrinógeno .....	58
1.7. Amplificación y Aceleración de la fibrinólisis .....	62
1.8. Inhibición del sistema de activación del plasminógeno .....	65
1.8.a. Inhibición de la plasmina .....	66
1.8.b. Inhibición de los activadores del plasminógeno.....	66
1.9. Proteólisis extracelular .....	68
1.9.a. Interacción de los componentes del sistema fibrinolítico durante la proteólisis extravascular ....	69
Capítulo 2. Consideraciones patológicas del Sistema Fibrinolítico .....	72
2.1. Patología del Sistema Fibrinolítico.....	74
2.1.a. Fibrinólisis Primaria .....	74
2.1.b. Fibrinólisis Secundaria.....	75
2.1.c. Coagulación intravascular diseminada (CID).....	76
2.1.d. Hipercoagulabilidad .....	80
Capitulo 3. Alteraciones de la Hemostasia en el Cáncer .....	82
3.1. Coagulación intravascular diseminada debida a malignidad .....	85
3.2. Fibrinólisis Primaria y Cáncer .....	86
3.3. Proceso metastásico y alteraciones de la hemostasis.....	90
3.4. Componentes del Sistema Fibrinolítico que intervienen en la invasión del tumor, metástasis y cascada de eventos .....	93
3.5. Aplicación clínica de los componentes del sistema fibrinolítico en el cáncer.....	98
3.6. Factores pronóstico en cáncer de mama .....	107
3.7. Alteraciones del sistema Fibrinolítico por medicamentos .....	116
Capitulo 4. Métodos de Estudio de la Fibrinólisis .....	123
4.1. Coagulométricos .....	126
4.1.a Cuantificación del Fibrinogeno por Técnica de Clauss .....	128
4.2. Cromogénicos .....	129
4.2.a. Determinación de plasminógeno (funcional) .....	134
4.2.b. Determinación del Activador Tisular del Plasminógeno ( t-PA ) .....	135

4.2.c. Determinación de $\alpha$ 2-antiplasmina ( APL) .....	135
4.2.d. Determinación del Inhibidor del Activador tisular del Plasminógeno ( PAI) .....	136
4.2.e. Determinación en 3 etapas de PAI .....	136
4.3. Inmunoenzimáticos.....	137
4.3.a. Aglutinación .....	139
4.3.a.1. Determinación de Dímeros D-D .....	140
4.3.a.2. Determinación de PDF/pdf .....	141
1.- Aglutinación de partículas de látex antifibrina .....	142
2.- Aglutinación de los estafilococos .....	142
30- Inhibición de la Aglutinación de eritrocitos tanados .....	143
4.3.b. Nefelométricos .....	143
4.3.b.1. PDF/pdf .....	146
4.3.c. Inmunodifusion .....	147
4.3.c.1. Inmunodifusión radial (IDR) .....	149
4.3.c.1. a. Deteminación de Plasminógeno .....	150
4.3.d. inmunoelectroforesis .....	150
4.3.d.1. sobre acetato de celulosa en capa capa delgada .....	152
4.3.d.2. IEB .....	153
4.3.d.2.a. Determinación de Plasminógeno.....	154
1.- Agradosa .....	154
2.- Acetato de Celulosa .....	154
4.3.e. Radio inmunoensayo (RIA) .....	155
4.3.f. Inmunoensayo enzimático (EIA) .....	156
4.3.f.1. Determinación de t-PA .....	159
4.3.f.2. Determinación de Dímeros D-D .....	160
4.3.f.2.a. Determinación de Complejos de Inhibición de serínproteasas .....	161
4.3.g. Fluoroinmunoensayo (FIA) .....	161
4.4. Diversos. ....	162
4.4.a. Lisis del coágulo .....	162
4.4.a.1. Tiempo de Lisis de sangre total.diluída.....	162
4.4.a.2. Tiempo de lisis de euglobulinas.....	162
4.4.b. Pruebas de Paracoagulación.....	163
4.4.b.1. Prueba de Etanol.....	164
4.4.b.2. Prueba de Sulfato de Protamina .....	165
4.4.c. Método de Placas de Fibrina. ....	166
4.4.c.1. Determinación de PAI. ....	167
4.4.d. Ensayo Funcional por Adsorción.....	168
4.5. Técnicas Histoquímicas .....	169
Capítulo 5. Conclusiones .....	171
Abreviaturas .....	174
Bibliografía .....	177



## INDICE DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Mecanismos Fisiológicos Antitrombóticos	9
Figura 2	Estructura modular de las proteínas de la coagulación y el sistema fibrinolítico	10
Figura 3	Localización de la secuencia fibrinolítica en la superficie de la Fibrina generada en respuesta a una lesión endotelial	12
Figura 4	Estructura modular de la protrombina, apolipoproteína y proteínas del sistema fibrinolítico	13
Figura 5	Secuencia de aminoácidos para el plasminógeno humano	17
Figura 6	Bases moleculares de la fibrinólisis y la importancia de glu y lis plasminógeno	19
Figura 7	Sitios de unión de la lisina	22
Figura 8	Estructura de u-PA de cadena sencilla y cadena doble	25
Figura 9.	Resumen de las reacciones de u-PA en la Activación del plasminógeno.	26
Figura 10.	Estructura primaria de u-PAR humano	30
Figura 11	Modelo para uroquinasa activada en una cascada de señalización que dirige a la adhesión, crecimiento y migración, celular	34
Figura 12	Camino de señalización dependiente-ERK, regula la motilidad	35
Figura 13	Representación esquemática de la reacción entre una serpina (I) y una serínproteasa (E)	39
Figura 14	Camino que puede seguir una serpina con su serínproteasa	41
Figura 15	PAI-2 asociado con múltiples procesos biológicos	49
Figura 16	Agentes que influyen la expresión del gen de PAI-2	50
Figura 17	Funciones no proteolíticas del sistema de activación del plasminógeno	56

Figura 18	Estructura del Fibrinógeno	59
Figura 19	Fibrinógeno y polimerización de la fibrina	60
Figura 20	Eventos moleculares en la amplificación y aceleración de la fibrinólisis.	62
Figura 21	Digestión de la fibrina por la plasmina	65
Figura 22	Regulación de la actividad del t-PA	67
Figura 23	Regulación de la Fibrinólisis.	73
Figura 24	Patogénesis de CID.	77
Figura 25	Focalización de la actividad proteolítica en la superficie de la célula tumoral	89
Figura 26	La activación del plasminógeno por u-PA	90
Figura 27	Invasión y Metástasis de un tumor sólido	93
Figura 28	Formación de Dímeros D-D	141
Figura 29	Principio de la nefelometría para medir las reacciones antígeno-anticuerpo	144
Figura 30	Curva de precipitación antígeno-anticuerpo	148
Figura 31	Diagrama de un inmuno ensayo enzimático homogéneo	157
Figura 32	Comparación de la fase heterogénea competitiva y el inmuno ensayo de sándwich	159
Figura 33	Mecanismo de la Paracoagulación	164

## INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características Moleculares de los componentes del sistema fibrinolítico	15
Tabla 2	Características bioquímicas de los componentes del sistema fibrinolítico	16
Tabla 3	Receptores en el sistema fibrinolítico	53
Tabla 4	Importancia clínica de los componentes del sistema del plasminógeno en cánceres humanos	101
Tabla 5	Determinantes de un estado fibrinolítico	116
Tabla 6	Medicamentos que modulan el sistema fibrinolítico	119
Tabla 7	Modulación del Sistema Fibrinolítico por productos derivados de plasma.	120
Tabla 8	Marcadores moleculares de la activación fibrinolítica.	121
Tabla 9	Sensibilidad de varias técnicas usadas para evaluar parámetros hemostáticos	137

## RESUMEN

El sistema fibrinolítico tiene un importante papel en la progresión del tumor y metástasis del cáncer, existe evidencia de la presencia de fibrina en sitios cercanos al tumor que inicia la cascada fibrinolítica así como la expresión de receptores para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa que transforma el plasminógeno en plasmina, la proteasa clave de la fibrinólisis. La actividad de esta proteasa es regulada por inhibidores específicos de sus activadores, las serpinas, PAI-1 principalmente, PAI-2 y PAI-3 (inhibidor de la proteína C, aun en estudio). La plasmina al ser generada en el microambiente del tumor, activa las proteasas, metaloproteinasas, factores de crecimiento, receptores fibrinolíticos que se unen a las integrinas y otros sistemas de adhesión en la membrana celular, induciendo señales de transducción en la células; la endocitosis de los receptores permite una reorganización espacial de los sistemas celulares y una selectiva digestión de los tejidos que rodean al tumor.

La sobre-expresión de estos componentes fibrinolíticos promueve el crecimiento, invasión y dispersión metastásica de las células tumorales por múltiples mecanismos, por los cuales, las células tumorales adquieren ventajas de supervivencia, crecimiento e implantación en un sitio secundario.

Actualmente se han hecho grandes mejoras en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, llevando a rangos de supervivencia del 50% al 70% en cáncer operable, cuando la detección de la enfermedad es temprana y la introducción de terapia

sistémica es a tiempo, por lo que la búsqueda de nuevos marcadores biológicos es importante para lograr un mayor rango de supervivencia y mejor calidad de vida.

Ciertos componentes del sistema fibrinolítico han sido identificados como marcadores pronósticos en cáncer humano, dependiendo de sus concentraciones en los extractos preparados de tejido fresco de su tumor primario, pueden clasificar a los pacientes en alto o bajo riesgo de sufrir metástasis y requerir de una terapia coadyuvante para una mayor supervivencia. Estos factores proteolíticos uPA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 han ganado aceptación clínica y parecen tener un mejor pronóstico que los factores histomorfologicos y mamográficos hasta ahora utilizados. En pacientes con nódulos linfáticos implicados según estos factores estándar, el 90% de ellos caen en alto riesgo y requieren de terapia sistémica, el 10% restante es un grupo de menor riesgo al cual se le deja sin terapia. De este grupo aproximadamente el 70% de pacientes nódulo negativos son curados de su enfermedad por cirugía local y radioterapia, de los cuales el 30% tienen recaída dentro de los diez años siguientes, por lo que estos factores pronóstico utilizados no son suficientemente sensibles para identificar el subgrupo de pacientes de bajo riesgo con enfermedad recurrente y ayudar a elegir una terapia individual.

Durante las dos últimas décadas, un agobiante numero de reportes demuestran la importancia del sistema del plasminógeno en el desarrollo del cáncer y su progresión, Duffy en 1987 fue el primero en establecer que las proteasas tenían que ver con los eventos de crecimiento y diseminación del tumor, posteriormente un considerable numero de estudios ha evaluado el valor pronóstico de estas proteasas

en muchos tipos de cánceres humanos, dándoles la categoría de fuertes e independientes factores pronóstico.

La importancia clínica encontrada en estos estudios nos indica en cáncer de mama en particular que la elevación de los niveles de u-PA, PAI-1 y u-PAR correlaciona con adverso pronóstico para el paciente, corta supervivencia libre de enfermedad y recaída, son pacientes con riesgo de sufrir invasión y metástasis del tumor, estos pacientes son candidatos a terapia sistémica, mientras que la elevación de PAI-2 aun con u-PA elevado, indica buen pronóstico de supervivencia libre de la enfermedad, son pacientes que no requieren terapia sistémica. Así mismo, con estos nuevos factores proteolíticos se puede beneficiar a los pacientes cuyos niveles de proteasas no sean elevadas, clasificándolos de bajo riesgo, donde la terapia sistémica no es necesaria y no se exponen a la toxicidad y alto costo de la misma.

Muchos medicamentos utilizados en el tratamiento de pacientes con cáncer producen alteraciones del sistema hemostático, uno de los más sensibles es el sistema fibrinolítico, al aumentar la liberación de activadores, disminuir los inhibidores o sufrir modificaciones las serínproteasas y el fibrinógeno, los mecanismos por los cuales los agentes quimioteráuticos son capaces de producir un estado fibrinolítico son múltiples.

La particular predisposición de los pacientes con enfermedades malignas a padecer alteraciones hemostáticas los conduce a desarrollar procesos trombóticos, hemorrágicos y estados subclínicos fibrinolíticos que pasan inadvertidos y puede llegar a hemorragias importantes por fibrinólisis primaria y secundaria a coagulación intravascular diseminada, esto en conjunto con las terapias citotóxicas,

antimicrobianas, transfusionales a las que son sometidos, hacen aun mas riesgosa su supervivencia. Por lo que es urgente identificar en estos pacientes su estado profibrinolítico antes de ser sometidos a dichas terapias y cirugías, donde la liberación del activador del plasminógeno que se encuentra en grandes cantidades en el tejido dañado lleva a un sangrado por fibrinólisis primaria.

Nuestra inquietud a este respecto nos ha hecho revisar y proponer pruebas de laboratorio que pongan de manifiesto dichos estados, desde pruebas sencillas y rutinarias así como pruebas confirmatorias en casos necesarios.

Las pruebas de tamizaje rutinarias de un laboratorio clínico, como son los tiempos de coagulación de rutina nos ayudan indirectamente a reflejar la sobre actividad fibrinolítica y consumo de factores.

Las pruebas que ponen de manifiesto la actividad fibrinolítica sistémica son esencialmente: tiempo de lisis del coágulo en sangre total, tiempo de lisis de euglobulinas, lisis de placas de fibrina para activadores y presencia de plasmina y PDF/f.

Un método alternativo para demostrar la fibrinólisis *in vivo* es demostrar la presencia de plasmina en el suero, al identificar el complejo Plasmina- $\alpha_2$  antiplasmina en la circulación utilizando métodos inmunológicos que determinan pequeñas cantidades y son más específicos.

Se puede generalizar que un paciente con sangrado anormal y evidencia de aumento de fibrinólisis con pruebas de coagulación normales (pruebas de tamizaje) y no-descenso de factores de coagulación, están indicando una fibrinólisis primaria; en cambio, fibrinólisis con anormalidad de los estudios de coagulación con evidente

disminución de factores puede deberse a coagulación intravascular aguda ó severa  
fibrinólisis primaria.

También se recomienda la determinación de sustratos en líquidos de drenaje  
para demostrar la activación fibrinolítica localizada por técnicas inmunológicas.



## INTRODUCCION

El cáncer constituye un problema de salud público enorme y costoso, tanto en términos económicos como en relación al sufrimiento humano que origina.

El cáncer ocupa unos de los primeros cinco lugares como causa de defunción y origina aproximadamente 4 millones de muertes anuales a nivel mundial; en el tercer mundo este porcentaje llega a ser superior al 10% y aumentará al erradicarse las enfermedades infecciosas y al incrementarse el promedio de vida de la población<sup>(46)</sup>.

El cáncer afecta a individuos de cualquier edad y sexo, pero especialmente a personas en edad productiva, entre 30 a 60 años. En México las estadísticas reportan mortalidad por neoplasias que alcanzan un 11% siendo el cáncer cérvico uterino y el de mama los principales en la mujer<sup>(46)</sup>.

En el cáncer de mama cerca de una de cada nueve mujeres puede padecerlo en algún momento de su vida. El cáncer de mama afecta principalmente a las mujeres, aunque ocurre 1% de los casos en el hombre. El riesgo aumenta con la edad, incrementándose rápidamente hasta la menopausia y continúa en ascenso después de esta, aunque en un índice menor. El riesgo es grande, las mujeres de 60 años o mayores tienen probabilidad de 3% a 4% de desarrollarlo durante cada decenio de vida<sup>(46)</sup>.

Existen varios factores que pueden afectar el riesgo de padecer cáncer de mama, uno es cultural y ambiental (probablemente dietético). Los riesgos mayores estadísticamente significativos e independientes se relacionan con antecedentes

familiares, antecedentes de enfermedades mamarias previas y antecedentes sobre reproducción y menstruales. Parece haber un factor de riesgo genético aunque su magnitud es motivo de debate y no se correlaciona con antecedentes étnicos o raciales. Aunque los factores de riesgo definidos epidemiológicamente ayudan a identificar a las mujeres en alto riesgo, 75% de cánceres de mama se presentan en mujeres que no tienen factores de riesgo importantes reconocidos <sup>(48)</sup>.

El término cáncer se refiere a las neoformaciones malignas, las que se producen en los epitelios (carcinomas), las que derivan del tejido conectivo (sarcomas), las que parten de las células de la glía del sistema nervioso central y las que se originan de los linfáticos y de los tejidos hematopoyéticos. El cáncer no es una sola enfermedad, sino engloba una serie de trastornos que tienen factores de riesgo diferente, localizaciones distintas y cuadros clínicos propios, evolución y pronóstico diverso, pero tienen en común en menor o mayor grado una serie de fundamentos biológicos que las distinguen de otros tipos de enfermedades.

Desde el punto de vista biológico las células tumorales crecen en forma anormal y descontrolada, invaden tejidos próximos y metastatizan a distancia, por lo que no están sujetas a la modulación de los mecanismos de control del organismo que regulan su comportamiento.

La transformación de la célula normal a célula tumoral significa adquirir en primer lugar, el fenotipo tumoral que garantiza su crecimiento como clona autónoma de crecimiento y posteriormente el fenotipo metastásico que determina la diseminación del tumor.

El fenotipo maligno o de tumorigenicidad es la culminación de una serie de cambios genéticos en los que participan tanto mecanismos reguladores positivos como negativos y que van a dotar a la célula de tres características esenciales: clonicidad, autonomía y anaplasia que la diferencia de las células normales.

Entre los factores positivos son la activación de ciertos oncogenes, el aumento de los factores de crecimiento y la activación permanente de la transmisión intracelular. Por otro lado los factores negativos que habitualmente frenan la posibilidad de una desviación de las células hacia la tumorigenicidad pueden encontrarse alterados. De ellos cabe destacar la pérdida de producción de citocinas inhibitoras del crecimiento como el factor transformador beta ( TGF-B ) que actúa en la superficie celular o de ciertos oncogenes supresores como el gen retinoblastoma ( RB ) o el p53 que actúan en el interior de la célula.

Sin embargo estos cambios aunque bastan para producir un tumor son insuficientes para generar la invasión y metástasis. Para ello se requieren cambios genéticos adicionales. Tanto positivos como negativos entre los positivos destacan los siguientes:

1. Ciertas proteínas que facilitan la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular.
2. Generación de proteasas que provocan una proteólisis y por tanto ruptura de la membrana basal.
3. Motilidad aumentada de la célula tumoral donde intervienen factores de crecimiento específicos que en definitiva confieren la dotación de pseudópodos a las células y,

#### 4. Factores angiogénicos que facilitan la vascularización del tumor.

Estos cambios se encuentran balanceados por otros que bloquean o regulan la producción de todos los anteriores y que son los llamados genes supresores de las metástasis de los que por el momento se han identificado dos, aquellos que actúan en el exterior celular bloqueando aspectos claves de la proteólisis y son los inhibidores de las metaloproteasas.

Por tanto las células tumorales para adquirir su total capacidad como célula maligna tiene 6 características que se han resumido anteriormente

1. Capacidad de ser autosuficientes para responder a las señales de crecimiento.
2. Adquirir la capacidad de ser insensibles a los genes supresores.
3. Adquirir la capacidad de eludir la apoptosis
4. Adquirir la ventaja de supervivencia
5. Adquirir la capacidad de angiogénesis

Adquirir la capacidad de difusión tumoral y metástasis. <sup>(51)</sup>

El cáncer de mama es un adenocarcinoma en el que se han logrado mayores adelantos y comprensión en lo referente al diagnóstico temprano, tratamiento y caracterización molecular. Los estudios clínicos que evalúan su tratamiento han demostrado dos principios oncológicos; a menudo es una enfermedad sistémica, cuyo pronóstico corresponde a una enfermedad metastásica sistémica clínicamente oculta desde el principio y las pacientes con enfermedad temprana tienen una carga tumoral sistémica más baja y mejor pronóstico, con o sin terapéutica sistémica, por lo tanto las estrategias básicas en el tratamiento del cáncer de mama son el

descubrimiento e inicio temprano de la terapéutica local definitiva y en el caso de mujeres de alto riesgo de recurrencia sistémica, intentar prevenir la recurrencia mediante terapéutica coadyuvante. Por lo que todo esto nos conduce a concluir que mejores métodos de diagnóstico y monitoreo en las etapas iniciales de dicha enfermedad, ayudan a un mejor manejo en estas pacientes, así se ha logrado aumentar los rangos de sobrevivencia de un 50% hasta un 70% en enfermedades con diagnóstico temprano y operables.

Las alteraciones de la hemostasia en pacientes con malignidades se basan en diversos mecanismos tales como la habilidad del tumor para alterar el sistema de coagulación al producir factores de coagulación en exceso o en un momento que no se requieren, o disminuir sus inhibidores, al incrementar la fibrinólisis o por inducir una alteración en los vasos sanguíneos en relación al estado de invasión local.

Los niveles elevados de los componentes del sistema fibrinolítico contribuyen a un agresivo potencial de las células cancerosas y su invasión al favorecer la reimplantación y la consolidación de un nuevo estroma del tumor.

El impacto de marcadores pronóstico en estados de malignidad para reflejar la sobrevivencia o el riesgo a presentar una remisión de la enfermedad, es una herramienta muy útil en el tratamiento del cáncer. Cada día se buscan nuevos marcadores que demuestren una relevancia biológica y clínica en las neoplasias, cualquier estudio con este objetivo es una prueba fehaciente de la lucha contra el cáncer que incluye la prevención, el diagnóstico temprano y el mejor manejo de esta enfermedad.

## FUNDAMENTO

Dada la dual funcionalidad del sistema del plasminógeno (proteolítico y no proteolítico) se ha iniciado el interés por evaluar su significado clínico en pacientes con tumores malignos. Todo nos invita al uso clínico de estos factores proteolíticos, tanto como agentes de diagnóstico y marcadores pronóstico, así como en estrategias terapéuticas contra el cáncer.

La particular predisposición de los pacientes con enfermedades malignas a padecer alteraciones hemostáticas los conduce a desarrollar procesos trombóticos, hemorrágicos y estados subclínicos fibrinolíticos que pasan inadvertidos y puede llegar a hemorragias importantes por fibrinólisis primaria y secundaria a CID, esto en conjunto con las terapias citotóxicas, antimicrobianas, transfusionales a las que son sometidos, hacen aún más riesgosa su sobrevivencia. Por lo que es urgente identificar en estos pacientes su estado profibrinolítico antes de ser sometidos a dichas terapias y cirugías.

Nuestra inquietud a este respecto nos ha hecho revisar y proponer pruebas de laboratorio que pongan de manifiesto dichos estados, desde pruebas sencillas y rutinarias así como pruebas confirmatorias en casos necesarios.

## **OBJETIVO**

El principal objetivo de esta revisión ha sido establecer la biología del sistema de proteasas del sistema fibrinolítico, los mecanismos fibrinolíticos que intervienen en el desarrollo y proliferación del cáncer, y posteriormente su uso clínico en el cáncer de mama como agentes de diagnóstico y marcadores tumorales.

## CAPÍTULO 1

### ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FIBRINOLISIS

#### 1.1 FIBRINOLISIS

Fibrinolisis es el término aplicado al proceso de disolución de la fibrina dentro del organismo. El principal interés en el proceso es remover y limitar el trombo intravascular, así como reparar el daño tisular en el cual la fibrina es frecuentemente depositada de manera difusa y así poder mantener la fluidez sanguínea <sup>(1)</sup>. Existe también evidencia que las células tumorales utilizan este proceso para su crecimiento y diseminación <sup>(4)</sup>.

El proceso de fibrinolisis resulta de la acción de un sistema enzimático en una forma similar al sistema de coagulación con el que interactúa en ciertos puntos. La reacción básica de este proceso es la activación de un zimógeno inactivo en una enzima activa de tipo serín proteasa, por hidrólisis enzimática selectiva de un enlace peptídico específico. Dos peculiaridades bioquímicas son comunes al mecanismo de activación de las enzimas de la coagulación y la fibrinolisis:

1. Las reacciones son iniciadas y propagadas en una superficie: la membrana celular y plaquetaria, la matriz subendotelial o la superficie de la fibrina.
2. Las reacciones están organizadas en un sistema de amplificación enzimática basado en una secuencia de activaciones de las enzimas generadas a activar única y exclusivamente al zimógeno que la prosigue, así la activación de la coagulación conduce a la generación de trombina, induce la agregación plaquetaria y culmina en la formación de una red insoluble de fibrina.



Consecutivamente, son desencadenados varios mecanismos protectores antitrombóticos de origen endotelial:

- La inhibición de la agregación plaquetaria y la vasodilatación por la prostaciclina y óxido nítrico.
- La inhibición de la formación de fibrina por la antitrombina III y el sistema de proteína C - proteína S, que inhiben los factores V y VIII activados por la coagulación, y
- La disolución del coágulo por el sistema fibrinolítico, principal mecanismo de defensa contra la trombosis y eliminación del exceso de fibrina, como se muestran en la figura 1 <sup>(2)</sup>.

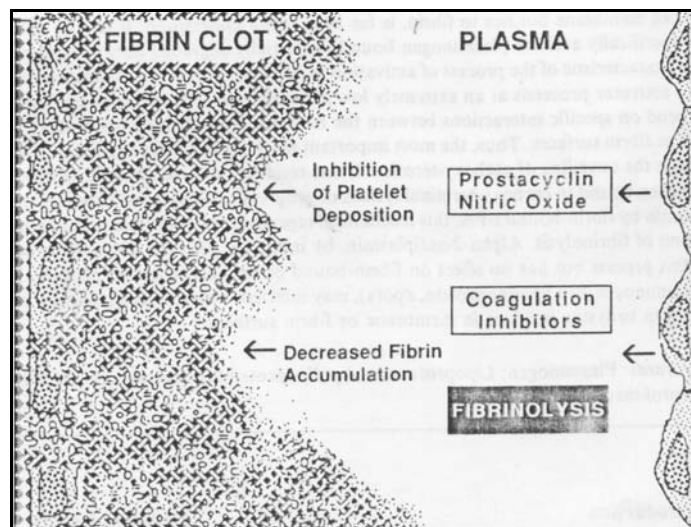


Figura 1. Mecanismos fisiológicos antitrombóticos: Inhibición de la agregación plaquetaria por la prostaciclina y el óxido nítrico, inhibición de los factores de la coagulación por inhibidores serín proteinasa y por proteína C activada y el sistema fibrinolítico <sup>(3)</sup>.

En ambos sistemas, coagulación y fibrinolisis las reacciones dependen de las proteínas de los sistemas como una unión de dominios estructurales con una especificidad funcional, ver figura 2, <sup>(3)</sup>.






<b>SIMBOLO</b>	<b>MODULO</b>	<b>FUNCION</b>
	<b>K = Kringle</b>	<b>Enlace Lis-Arg</b>
	<b>G = Factor de crecimiento</b>	<b>Enlace-Receptor</b>
	<b>C = Vit-K dependiente de enlace de calcio</b>	<b>Enlace-calcio</b>
	<b>F = Finger</b>	<b>Enlace-Fibrina</b>
	<b>P = Proteasa</b>	<b>Serinproteasa</b>

Figura 2. Estructura modular de las proteínas de la coagulación y el sistema fibrinolítico <sup>(4)</sup>.

Algunos de estos dominios median el enlace de activadores y el plasminógeno a la superficie de la fibrina, a las proteínas de la matriz extracelular y de las membranas celulares. Este alto grado de especificidad y de afinidad de unión de enzimas y sustratos a los específicos sitios de enlace de estas superficies promueve cambios conformacionales que:

1. Hacen accesible el sitio de hidrólisis del enlace peptídico del sustrato de la proteinasa activa y da como resultado .

2. Un sitio proteolítico de unión de dicho enlace peptídico, esto se encuentra limitado por una constante de Michaelis extremadamente baja y una alta velocidad catalítica. Las enzimas activas generadas permanecen unidas a la superficie a través de dominios que también median sus interacciones con inhibidores serín proteasas específicos <sup>(2)</sup>.

Las enzimas del sistema fibrinolítico son plasmina, activador tisular del plasminógeno (t-PA) y activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) que se encuentran solamente en la fase fluida (sangre y fluidos extravasculares) donde los inhibidores también están presentes, alfa 2 antiplasmina ( $\alpha$ 2 antiplasmina ) y los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs), PAI-1, PAI-2. Las tablas 1 y 2 nos muestran algunas características moleculares como bioquímicas de los componentes del sistema fibrinolítico <sup>(1)</sup>.

La plasmina unida a la fibrina no es inhibida por la alfa 2 antiplasmina, mientras su interacción en plasma es una de las más rápidas. La activación de la fase sólida y la inhibición de la fase líquida asegura la especificidad de la fibrinólisis y el grado de control de la degradación de la fibrina. El daño en el sistema fibrinolítico lleva a un defecto en su activación y un exceso en su inhibición.

La capacidad de la fibrina para unirse al plasminógeno y a sus activadores y la unión del plasminógeno a la superficie celular para su activación es el mecanismo de proteólisis extracelular de mayor distribución en el organismo. La unión del sistema de plasminógeno a la superficie del coágulo de fibrina es el principal mecanismo contra la trombosis, mientras que la unión de dicho sistema a la superficie celular

contribuye a una variedad de funciones celulares normales como son la ovulación, desarrollo del embrión, curación de las heridas y angiogénesis, también ha sido implicado en situaciones patológicas tales como la invasión de células tumorales (3).

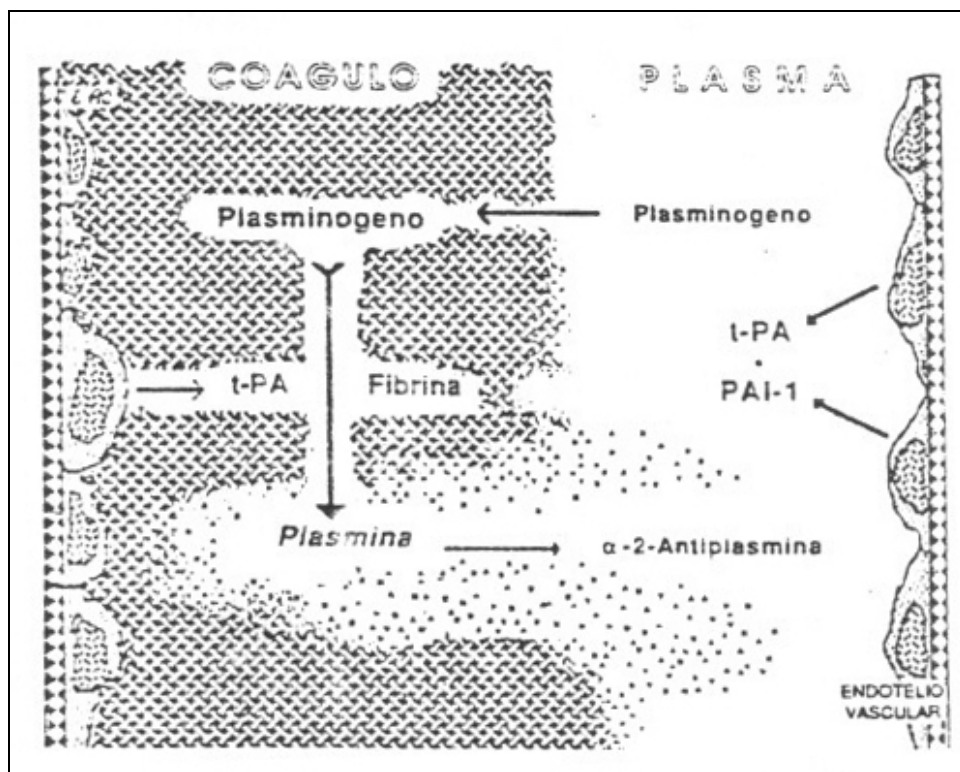


Figura 3. Localización de la secuencia fibrinolítica en la superficie de la fibrina generada en respuesta a una lesión endotelial (2).

## 1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL PLASMINOGENO Y SUS ACTIVADORES

### ACTIVADORES

El plasminógeno y sus activadores son secretados por el hígado como glucoproteínas de cadena simple y son subsecuentemente transformados en enzimas de cadena doble que contiene dominios serínproteasa en su región carboxi terminal y un número definido de módulos en su región amino- terminal <sup>(1)</sup> .

Las serínproteasas del sistema fibrinolítico se muestran en la siguiente figura:

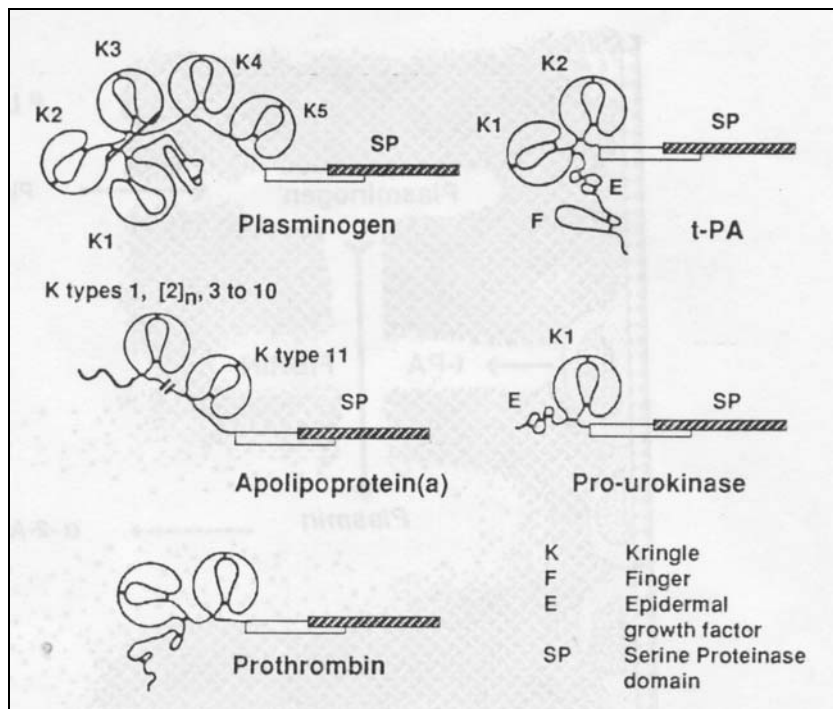


Figura 4. Estructura modular de la protrombina, apolipoproteína y proteínas del sistema fibrinolítico <sup>(3)</sup> .

El dominio serínproteasa que se encuentra en la cadena ligera carboxi terminal o cadena B de las moléculas, rompe preferentemente los enlaces peptídicos Arg-Lis en sus substratos. Con respecto a los otros dominios, los dos activadores del plasminógeno y el mismo plasminógeno difieren en su estructura modular: t-PA contiene 2 dominios kringle y un finger que tienen afinidad por la fibrina e incrementan la actividad de la enzima que los contiene así como su especificidad por la fibrina y su dependencia para su activación, en contraste u-PA contiene solamente un dominio Kringle y el dominio factor de crecimiento, este último es importante como enlace a un receptor. De las estructuras de estos dos activadores se deducen sus funciones diferentes con respecto a sus actividades. Mientras que t-PA es un activador pobre en ausencia de fibrina por la interacción con ella a través de sus dominios finger y por los enlaces lisina en su dominio Kringle 2 con lo cual su actividad incrementa y por lo que es responsable de la disolución de la fibrina formada en la circulación. La actividad de u-PA no es dependiente de la fibrina, se une principalmente a receptores celulares a través de su dominio EGF y funciona localmente como un disparador de la cascada proteolítica capaz de digerir la matriz extracelular<sup>(4)</sup>.

Los principales componentes del sistema fibrinolítico se muestran en la siguiente tabla con algunas de sus propiedades moleculares.

Componente	Peso molecular	Amino ácidos	Hidratos de Carbono %	Centros reactivos	Dominios
Plasminógeno	92	791	2	His 602 Asp 654 Ser 740	5 Kringles
t-PA	70	530	7/13	His 322 Asp 371 Ser 478	1 finger 1 EGF 2 kringles
u-PA	54/33	411	7	His 204 Asp 255 Ser 356	1 kringle 1 EGF
$\alpha$ 2-antiplasmina	70	452	13	Arg 364 Met 365	
PAI-1	52	379		Arg 346 Met 347	
PAI-2	46/60	393		Arg 358 Tre 359	

Tabla 1. Características Moleculares de los componentes del sistema fibrinolítico <sup>(4)</sup> .

La tabla 2 muestra algunas de sus características bioquímicas.

Componente	Síntesis	Concentración plasmática Mg/mL	Vida Media Plasmática
Plasminógeno	Hígado	200	2.2 días (Glu-Pgno) 0.8 días (Lis-Pgno)
t-PA	Células endoteliales	0.005	5 min
u-PA	Leucocitos polimorfonucleares, epitelio, macrófagos estimulados, células tumorales, fibroblastos	0.008	5-10 min
$\alpha$ 2-antiplasmina	Hígado y plaquetas	70	2.6 días
PAI-1	Hígado, células endoteliales, plaquetas, placenta	0.05	
PAI-2	Polimorfonucleares placenta	<0.005	

Tabla 2. Características bioquímicas de los componentes del sistema fibrinolítico: Glu-Pgno Glu plasminógeno, Lis-Pgno Lis-plasminógeno <sup>(4)</sup>.

### 1.2.a. Plasminógeno

El plasminógeno glucoproteína de peso molecular de 93 000 (Mr), de 791 amino ácidos, 11 de ellos distribuidos en cinco módulos Kringle, el módulo catalítico y una secuencia aminoterminal de 67 aminoácidos con un ácido glutámico en la misma región como se muestra en la figura 5 <sup>(2)</sup>. Es sintetizado por el hígado y circula en el plasma a una concentración de 1.5  $\mu$ M, su vida media es de 2.2 días.



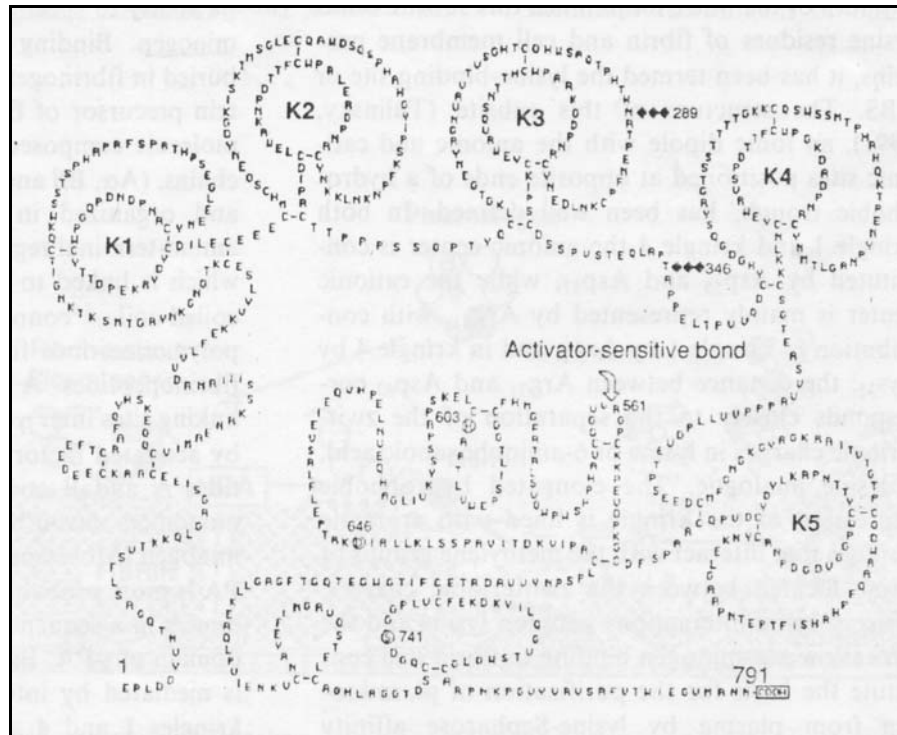


Figura 5. Secuencia de aminoácidos para el plasminógeno humano por Petersen y colaboradores, 1990. La flecha abierta indica la unión peptídica Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> que es hidrolizada por los activadores para transformar el plasminógeno a plasmina. Treo<sup>346</sup> y Asp<sup>289</sup> son sitios de glucosilación y His<sup>603</sup>, Asp<sup>646</sup> y Ser<sup>741</sup> son componentes del sitio activo.

El plasminógeno es transformado por sus activadores en una enzima de cadena doble, la plasmina, por la hidrólisis del enlace peptídico Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup>. El dominio serínproteasa está localizado en la región carboxi terminal (Val<sup>562</sup>-Asn<sup>791</sup>) y contiene el centro catalítico activo, mientras que la región amino terminal posee 5 secuencias homólogas o dominios kringle y una región peptídica amino terminal de 77 residuos que pueden ser liberados por la plasmina hidrolizando un enlace peptídico lisil.

El plasminógeno nativo posee un ácido glutámico en su región amino terminal (Glu-plasminógeno), este péptido puede ser eliminado de la molécula nativa mientras el residuo correspondiente en la forma hidrolizada por la plasmina es lis-plasminógeno corresponde a la lisina, esta forma no es normalmente encontrada en el plasma humano y estudios in vitro indican que no es una forma intermedia en la activación de plasminógeno a plasmina unida a fibrina <sup>(3)</sup>. En la figura 6 se muestra la producción de glu y lis plaminógeno.

Se han aislado 2 tipos de plasminógeno en el plasma humano: ambos se encuentran glucosilados en diferentes aminoácidos, el tipo II en Tre346 (situado en la región del inter kringle 3 y el 4), el tipo I en Asn289 (localizado en el kringle 3). Los kringles 1 y 4 median el enlace del plasminógeno a los residuos de lisina presentes en la superficie de la fibrina o de las membranas celulares.

Para entender la importancia de producción de glu y lis-plasminógeno se ha retornado a las bases moleculares: pared del vaso → daño tisular → producción de fibrina.

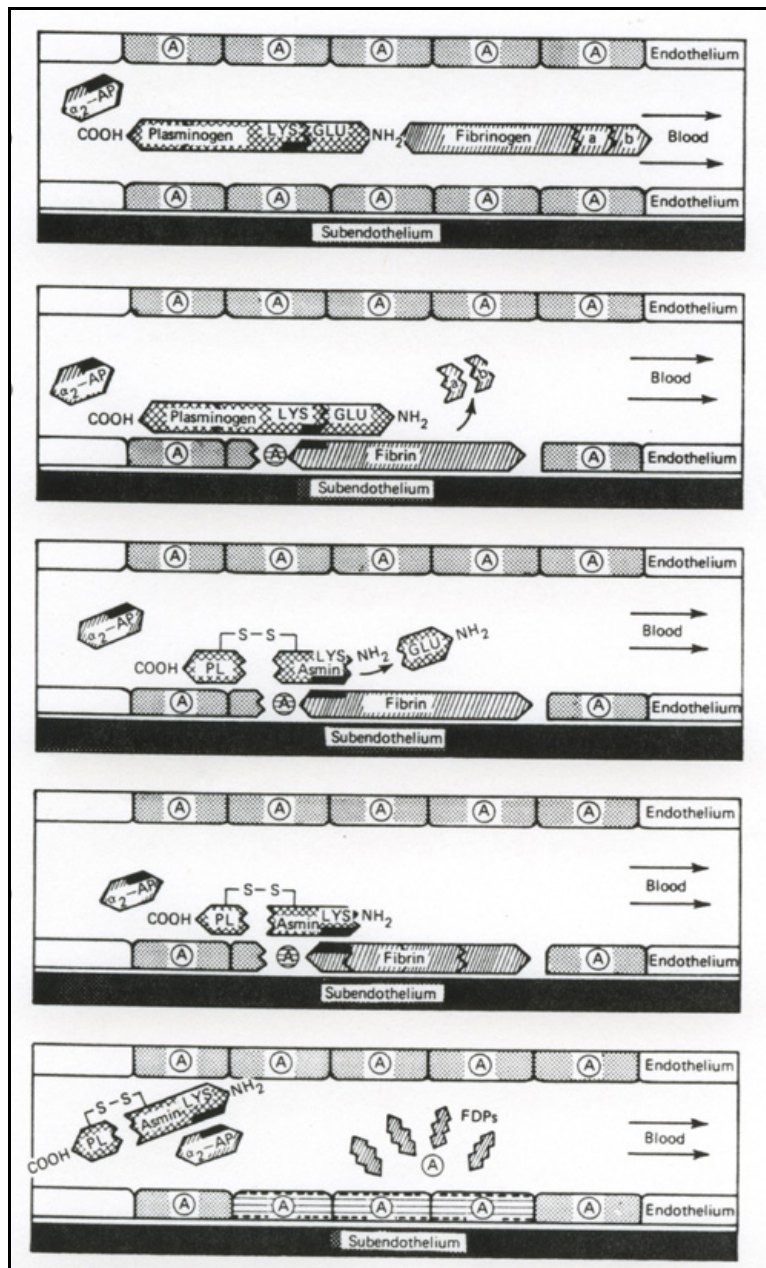


Figura 6. Bases moleculares de la fibrinolisis y la importancia de glu y lis plasminógeno<sup>(44)</sup>.

1. La célula endotelial vascular sintetiza, almacena y libera t-PA, el plasma contiene glu-plasminógeno y  $\alpha 2$  antiplasmina, inhibidor de la plasmina.
2. El daño tisular expone el subendotelio y permite la activación de la cascada de la coagulación y la formación de fibrina. La fibrina cubre el subendotelio expuesto y absorbe plasminógeno en sitios de unión a la lisina.

3. El activador tisular del plasminógeno se une a la fibrina incrementando su capacidad de activación del plasminógeno, hidroliza la unión arginina-valina en la porción carboxi terminal resultando glu-plasminógeno, el cual rompe pequeños péptidos de la porción amino terminal de la molécula exponiendo la lisina y produciendo cambios moleculares conformacionales. El lis-plasminógeno formado es más sensible a la digestión del activador formándose más cantidad de plasmina.
4. La fibrina localizada es digerida por la plasmina y se producen los productos solubles de degradación
5. La plasmina libre es rápidamente unida y neutralizada por su inhibidor

### **1.2.a.1. Propiedades estructurales y funcionales de los dominios**

#### **Kringles del plasminógeno**

Los kringles son secuencias de 80 – 90 aminoácidos arreglados en una estructura terciaria en círculo que contiene 3 vueltas internas y es estabilizada rígidamente por 3 puentes disulfuro.

Los dominios kringle del plasminógeno numerados del 1 al 5, difieren entre si, aunque tienen un 50 % de secuencia homóloga, se encuentran conectados al dominio proteinasa por una secuencia que contiene el sitio de hidrólisis Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> (3).

Los kringles 1 y 4 contienen subsitios funcionales formados primariamente por residuos de amino ácidos en el círculo interno, éstas estructuras específicas se conocen como sitios de fijación a la lisina, ahora denominados LBS, donde se unen a la fibrina y membranas celulares. La estructura de este subsitio es un dipolo iónico con sitios opuestos aniónicos de los catiónicos de una pared hidrofóbica (figura 7), en ambos kringles el centro aniónico esta constituido por Asp<sub>55</sub> y Asp<sub>57</sub>, mientras que el centro catiónico es principalmente representado por Arg<sub>71</sub> y Arg<sub>57</sub> en el kringle 1 y

con Asp<sub>57</sub> y Lis<sub>35</sub> en el kringle 4, la distancia entre Arg<sub>71</sub> y Asp<sub>57</sub> corresponde a la separación de cargas iónicas en lisina o ácido aminohexagónico análogo a la lisina. La depresión hidrofóbica del kringle está ocupada de residuos aromáticos que interactúan con los grupos metileno de la lisina colocada entre las cargas estereoquímicas.

Estas interacciones específicas entre la lisina y el sitio de unión a la lisina, permite al plasminógeno unirse a la fibrina y a las membranas celulares <sup>(3)</sup>. Cualquier sutil variación en los aminoácidos que forman la estructura del sitio de unión puede alterar la habilidad de los kringles para unirse a estos residuos de lisina de la fibrina. Los dominios kringle también permiten la unión de plasminógeno/plasmina a los residuos de lisina disponibles en la superficie de la matriz extracelular. La plasmina es capaz de degradar algunas proteínas de la ECM tales como fibronectina, vitronectina, fibrina y así mismo activar formas zimógenas de varias metaloproteinasas <sup>(82)</sup>. La plasmina también es responsable de la liberación de factores angiogénicos y de crecimiento en la ECM <sup>(41, 82)</sup>.

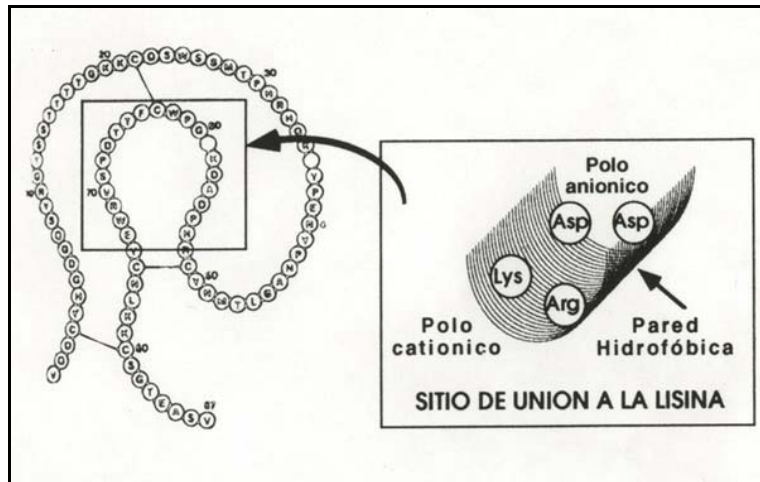


Figura 7. Sitios de unión de la lisina <sup>(41)</sup>.

### 1.2.b. Los activadores del plasminógeno

Los dos activadores del plasminógeno son secretados como glucoproteínas de cadena sencilla que son transformados en enzimas de dos cadenas que contienen un dominio serínproteasa en la región carboxiterminal y un determinado número de módulos en la región amino terminal. Se han descrito dos tipos de activadores del plasminógeno, Activador tisular del plasminógeno, t-PA (Mr 70 000) el cual tiene gran afinidad por la fibrina y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa, u-PA, (Mr 54 000) que es independiente de la fibrina, ambos en sus cadenas dobles y sencillas tienen similar actividad fibrinolítica, pero uPA en su cadena sencilla es considerado como pro-enzima (también conocida como pro-uroquinasa) que deberá ser transformado en uroquinasa, la cadena doble es la forma activa, pro-uroquinasa puede participar junto con t-AP en fibrinolisis por un mecanismo que no necesita unión a la fibrina <sup>(3)</sup>.

La región amino terminal de t-PA contiene 3 tipos de módulos funcionales, un dominio finger (residuos 1-43) que se une al fragmento D de la fibrina (una secuencia peptídica de la cadena alfa de la fibrina y permite su fijación a la superficie del coágulo <sup>(41)</sup>; un dominio constituido por residuos 44-91, homólogos al factor de crecimiento epidérmico, que media la unión a receptores celulares con el hepatocito; y dos dominios kringle, uno de ellos (el kringle tipo 2) reconoce residuos de lisina en la superficie de la fibrina <sup>(3)</sup>, y el módulo catalítico que contiene la tríada, serina, histidina, arginina, que lo define como una enzima de tipo serínproteasa <sup>(4)</sup>.

Mientras t-AP por si mismo es un pobre activador en ausencia de fibrina, al interactuar con ella a través de su dominio finger y al enlazarse a la fibrina por los residuos de lisina en el Kringle 2, su actividad se ve aumentada en orden de 3 veces su magnitud y es responsable de la disolución del coágulo formado en la circulación. Es importante mencionar que la acción de la plasmina en la fibrina genera residuos lisina terminal incrementando aún más la unión al plasminógeno y proveyendo un aumento positivo en el mecanismo de regulación (retroalimentación positiva). Es también de notarse que la unión a la fibrina no solamente causa un cambio conformacional en t-PA sino también induce la forma Lis-plasminógeno.

La activación de u-PA por otro lado no es dependiente de fibrina, principalmente se une a receptores celulares y funciona localmente para iniciar la cascada proteolítica en la matriz extracelular <sup>(4)</sup>.

La cadena A de la región amino terminal de u-PA está caracterizada por dos determinantes estructurales, un módulo factor de crecimiento (GFD) y un módulo kringle <sup>(6)</sup>, el GFD que se une a receptores celulares, principalmente con u-PAR, tiene

gran semejanza EGF en particular con respecto a la posición de los residuos de cisteína, el dominio kringle con estructuras similares a los miembros de estas familias y que no tiene afinidad por los residuos de lisina <sup>(4,6)</sup> contiene una secuencia que interactúa con su inhibidor específico PAI-1 y a otros receptores de la membrana celular <sup>(82)</sup>. En el dominio carboxi terminal se encuentra el centro catalítico, dicho sitio activo de la enzima representado por la triada de aminoácidos específicos de serínproteasas, His<sub>204</sub>, Asn<sub>255</sub> y Ser<sub>356</sub> <sup>(82)</sup>. Cada dominio de la proteína tiene una estructura rígida soportada por enlaces internos de disulfuro, tres de los cuales se localizan en el dominio GFD, tres en el dominio Kringle y seis en el dominio proteolítico, los cuales mantienen la debida orientación de los residuos de aminoácidos en el centro activo de la proteasa.

Los módulos finger y kringle 2 no forman parte de esta proteína, lo cual explica la falta de afinidad de la pro u-PA por la fibrina <sup>(6)</sup>.

La prouroquinasa por mucho tiempo fue considerada como un precursor de la proteína, sin embargo puede convertir el plasminógeno en plasmina, la plasmina a su vez activa más uroquinasa al hidrolizar los enlaces peptídicos Lis<sub>158</sub>-Ile<sub>159</sub> y convertir la uroquinasa de cadena sencilla en doble cadena que es 200 veces más potente. La cadena B, como se muestra en la Figura 8, con ile<sub>159</sub> en el final de la cadena, se relocaliza en la bolsa de unión del sustrato, formando un par iónico entre el NH<sub>2</sub>- del la Ile<sub>159</sub> y el lado de la cadena de Asp<sub>255</sub>; estos cambios de conformación de la molécula, resultan en abrir el sitio de unión del sustrato en el sitio activo de la enzima <sup>(82)</sup>.

u-PA de doble cadena, se encuentran unidas por un enlace disulfuro en



Cis<sub>148</sub> y Cis<sub>149</sub>, la cadena A contiene los dominios K y G, mientras que el dominio proteolítico se encuentra en B, por lo que tiene la actividad enzimática catalítica dotada de propiedades de una arginesterasa. Una forma hidrolizada de u-PA, consistente de una cadena B intacta y una pequeña región carboxi terminal de la cadena A, tiene especificidad por sustrato y actividad catalítica específica comparable a la de la enzima intacta <sup>(6, 82)</sup>.

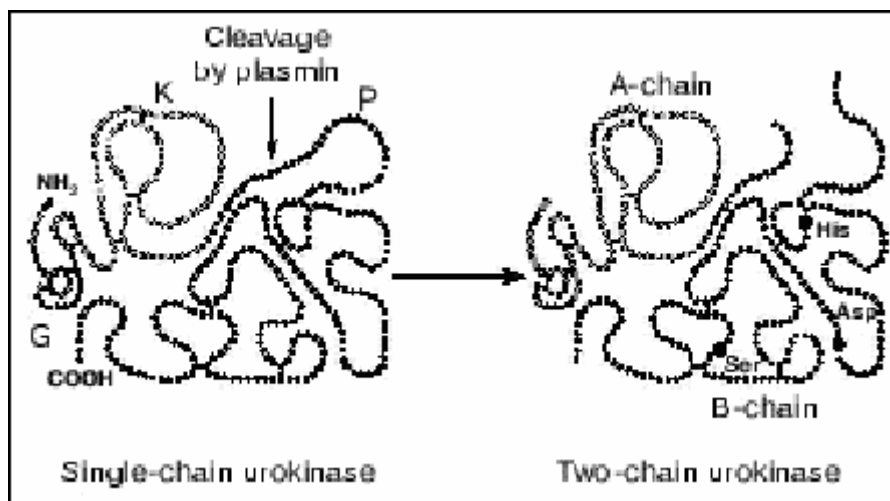


Fig. 8.- Estructura de uPA. simple cadena y doble cadena (G, dominio GFD, K kringle dominio y P, dominio proteasa) <sup>(82)</sup>.

Como todas las demás serin proteasas y en contraste con t-AP, la forma de cadena sencilla de u-AP (pro-u-PA) tiene muy poca actividad catalítica. (6) La activación de pro u-PA se ha postulado bajo ciertas circunstancias y enzimas entre ellas la más probable es la plasmina, así también se ha postulado el más eficiente sistema de generación de plasmina incluye a la plasmina y sus zimógenos a través de unión en la superficie celular de un complejo multimolecular que contenga a u-PA <sup>(6)</sup>.

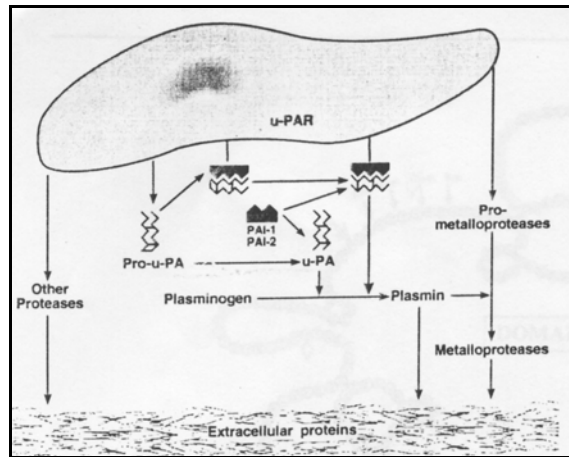


Figura 9. Resumen de las reacciones de uPA en la Activación del plasminógeno <sup>(6)</sup>.

El u-PA es producido por una variedad de células y tejidos; células epiteliales del riñón, células de estructuras ductales o tubulares, alveolares, del tracto genital, glándula mamaria y otros tejidos exócrinos. También se encuentra involucrado en los procesos de migración celular en procesos invasivos tanto de estados no patológicos como patológicos. Un ejemplo específico de proceso migratorio es la implantación del embrión de mamíferos como uno de los más espectaculares, los trofoblastos invasivos producen u-PA, y la actividad proteolítica ayuda al blastocito a penetrar el endometrio y despusle un espacio para la implantación y el desarrollo del embrión. Las células inflamatorias, leucocitos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos actúan también como células migratorias e invasivas, de su sitio de producción en la médula ósea a través de la circulación a los sitios tisulares o de inflamación, atraviesan el endotelio vascular y otras barreras. Los agonistas inflamatorios entre ellos algunas citocinas, promueven la producción de u-PA por estas células mientras

que los antagonistas tales como los glucocorticoides, disminuyen la expresión del gen de u-PA <sup>(6, 82)</sup>.

Las células con extraordinarias propiedades migratorias son el embrión y en el adulto las células endoteliales vasculares. Bajo la influencia de factores angiogénicos, en particular de (bFGF) factor de crecimiento de fibroblastos y (VEGF) factor de crecimiento endotelial vascular, las células son inducidas a romper su límite de membrana basal para migrar e invadir la matriz extracelular y finalmente reconstituir una continua red de ramificaciones de capilares.

La angiogénesis es el fenómeno clave durante el desarrollo del embrión y los mismos eventos ocurren cíclicamente durante la formación del cuerpo lúteo y el desarrollo del endometrio en las mujeres adultas.

En la angiogénesis un aspecto crítico de la proteólisis extracelular en circunstancias fisiológicas en la remodelación de la matriz extracelular durante el proceso de migración celular, en la que los constituyentes de dicha matriz sufren destrucción, debe ser localizada y controlada evitando un daño irreparable a la estructura del tejido invadido en el que no se efectuaría la migración. Debe ser un balance proteolítico y antiproteolítico perfectamente sincronizado. Una alteración o sobreexpresión de alguno de los constituyentes de dicho sistema altera la fina regulación del mismo y produciendo un estado patológico <sup>(6)</sup>.

En cambio varios estímulos producen liberación de t-PA del endotelio vascular a la circulación: oclusión venosa, ejercicio físico, anoxia, shock, shock eléctrico, hiperpirexia, etc.

La actividad inmunológica plasmática del t-PA es muy baja, 5 a 10 ng/mL y no se corresponde con la actividad biológica, debido a que la mayor parte esta conformando complejos con el inhibidor PAI-1 y, solo un 5% se encuentra en forma libre.

En presencia de fibrina, el t-PA y el plasminógeno se unen a la misma formando un complejo ternario, y esto permite la conversión mucho más eficiente a plasmina del glu-plasminógeno.

La producción y liberación normal de t-PA es indispensable para prevenir enfermedad tromboembólica y una buena actividad fibrinolítica.

### **1.2.c. El Receptor para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa, u-PAR**

La importancia de que el proceso de proteólisis extracelular catalizada por u-PA fuera controlada específicamente, llevó a la conclusión de la existencia de un sitio de recepción para dicho activador en las mismas células y en la membrana plasmática involucrada en dicho proceso <sup>(6)</sup>.

La identificación de un receptor para u-PA secretado en la superficie celular asume el control de que la proteólisis extracelular, limita la zona afectada y concentra la actividad de la proteasa en un sitio estricto de la superficie celular, evitando la destrucción de mayor parte del tejido no involucrado en el proceso de migración celular <sup>(6, 25)</sup>.

El u-PAR es una glucoproteína de 55 a 60 KDa <sup>(7, 10)</sup>, contiene en su región carboxi terminal 31 amino ácidos, dicha región altamente hidrofóbica, contiene

también el sitio de adhesión y de señal por un glicerofosfolípido de anclaje, el glicerofosfatidilinositol (GPI), localizado entre la serina<sub>282</sub> y glicina<sub>283</sub> <sup>(7)</sup>. En su dominio amino terminal, se encuentra el sitio de unión de pro-u-PA <sup>(6)</sup>.

El u-PAR maduro, contiene 28 cisteínas presentes también en otras proteínas de anclaje de membrana, la familia Li-6, estos residuos de cisteína solamente forman enlaces disulfuro intradominios <sup>(6)</sup>.

En u-PAR maduro existen también 5 sitios de glucosilación, uno de los cuales se encuentra en la región amino terminal en el residuo asparagina<sub>52</sub> en el dominio I de unión, los otros dominios aún no están bien estudiados <sup>(7)</sup>. Esta unión de hidratos de carbono tiene la función de modular la unión del ligando, la unión de u-PA se localiza en uno de los 7 residuos que forman la asa  $\Omega$  en el dominio I <sup>(82)</sup>.

La proteína estructural anclada en la membrana plasmática por la molécula de glicerofosfatidilinositol (GPI), es fijada a la proteína durante eventos postraduccionales los cuales incluyen un paso de hidrólisis en la parte carboxi terminal previa a la unión de la molécula de glucolípido, en el receptor humano se cree es Gli<sub>283</sub>. GPI genera una señal al lado citosólico de la membrana plasmática a través de señales de transducción, en particular a través de fosforilación de proteínas, tirosin cinasas que se encuentran asociadas a GPI <sup>(10, 25)</sup>.

La figura 10 nos muestra la estructura primaria del u-PAR humano.

### 1.2.c.1. La expresión de u-PAR

La expresión del receptor de u-PA está íntimamente relacionado con el fenotipo celular, al igual que el número de receptores, la afinidad y su distribución<sup>(6)</sup>. La expresión de u-PAR se ha identificado en muchas líneas celulares, entre ellas en células circulantes como leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos T y linfocitos NK, macrófagos alveolares, queratinocitos, trofoblastos, miocitos, endotelio vascular, músculo liso<sup>(6, 7)</sup>.

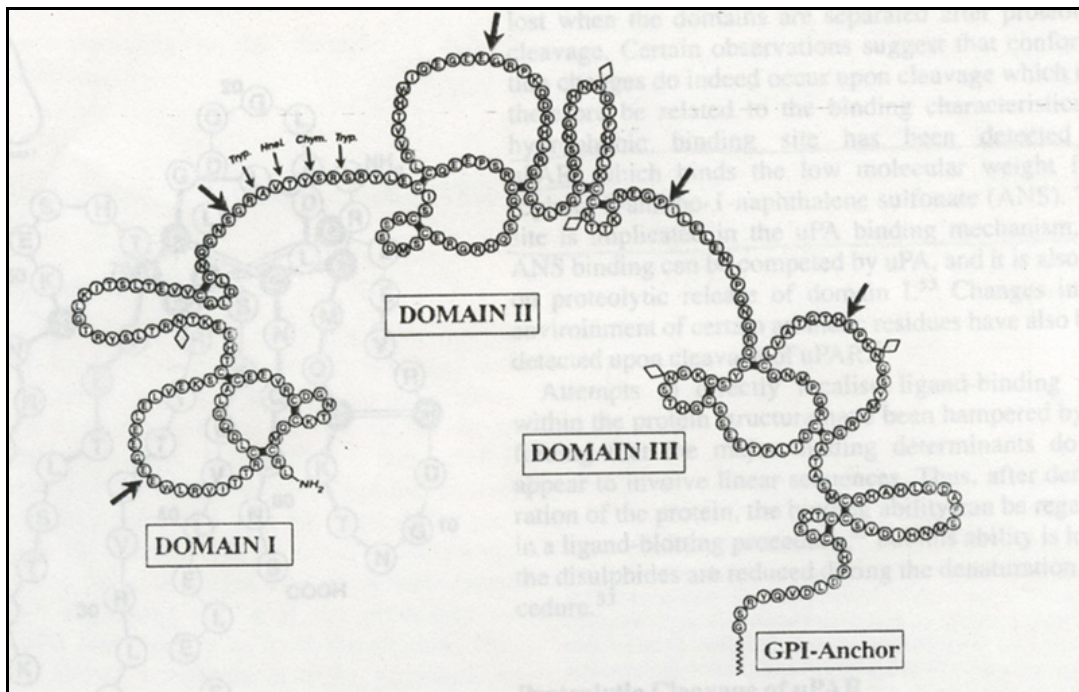


Figura 10. Estructura primaria de u-PAR humano<sup>(10)</sup>.

Las características bioquímicas del receptor en las diferentes células es similar y radica en el diseño o límite de glucosilación, lo cual le confiere cierta afinidad y expresión en cada tipo celular<sup>(6)</sup>.

Los monocitos y neutrófilos normales contienen u-PA y u-PAR y estas proteínas en conjunto con otros sistemas proteolíticos las utilizan al ser activados para migrar a los tejidos. En los neutrófilos u-PAR y u-PA se encuentran almacenados en algún compartimiento de los gránulos que rápidamente translocan y fusionan con la membrana plasmática cuando se estimulan <sup>(10)</sup>.

En el tracto gastrointestinal, u-PAR es expresado por las células epiteliales lumbinales situadas cerca de las células similares a fibroblastos que producen uPA en la lamina propia, así la generación de plasmina es controlada en los puntos específicos por cooperación de ambos tipos de células. Durante el proceso de cicatrización en la piel, u-PAR es expresado por los queratinocitos localizados en la capa de células epiteliales que migran debajo de la herida. u-PA y PAI también son expresados en los queratinocitos que migran indicando que las tres moléculas están implicadas en la regulación de la proteólisis extracelular durante la migración de los queratinocitos <sup>(10)</sup>.

Cuando se inducen las células endoteliales a migrar en una respuesta a una señal angiogénica, se expresan un incremento en los niveles de u-PA y su receptor, mediado por citocinas, en particular por factores de crecimiento para fibroblastos que activan por lo menos de una manera autócrina a la célula, la cual expresa más actividad enzimática de u-PA y mayor expresión de receptores en la membrana celular. Bajo estas condiciones hay una degradación del sitio subyacente de la membrana basal, se invade la matriz extracelular, las células incrementan la actividad de u-PA en la superficie y se expresan más receptores plasmáticos; esto

confirma que la interacción de u-PA/u-PAR es un parámetro importante en la migración celular <sup>(6, 10, 25)</sup>.

La polarización de los receptores va de acuerdo a que uPAR sirve como un sitio de activación del plasminógeno en la región de la membrana plasmática donde la proteólisis se requiere para la migración celular <sup>(6)</sup>.

La expresión de u-PAR por células malignas se basa en la localización de la actividad proteolítica en la superficie celular como una importante actividad en la migración celular y por lo tanto en la invasión y metástasis. Los reportes existentes indican que las células malignas por lo menos en ciertos tumores expresan el receptor de u-PA, los primeros reportes fueron de adenocarcinomas de colon, más recientemente para carcinomas de mama y melanomas en estadios avanzados <sup>(6)</sup>.

### **1.2.c.2. Aspectos funcionales de la internalización del receptor**

A diferencia de otros receptores que endocitan su ligando extracelular rápidamente, u-PAR no internaliza u-PA ligando; este permanece completamente activo en la superficie celular durante 4 a 6 hrs, de vida media a 37°C, dependiendo del sistema celular. Diferentes inhibidores de la plasmina ( $\alpha_2$  antiplasmina) para la plasmina en fase fluida, inhibidores de u-PA (PAIs) son capaces de interactuar con u-PA unido a u-PAR e inhibir su actividad enzimática en la superficie celular <sup>(7)</sup>. También complejos preformados uPA/PAIs, se pueden unir al receptor aunque con menor afinidad que uPA libre. Una vez que el complejo uPAR/uPA/PAI-1 se ha formado en la superficie celular, se lleva a cabo otro importante proceso, la rápida



internalización y degradación de dicho complejo (u-PA/PAI-1) por enzimas lisosomales. u-PA unido al receptor es menos susceptible a la acción de los inhibidores que la enzima libre, pero esta unión no la protege de su acción <sup>(7, 74, 75)</sup>.

Existen receptores adicionales en este proceso de internalización, receptores pertenecientes a la familia de lipoproteínas de baja densidad: LRP es el receptor relacionado a proteína un receptor de proteínas de baja densidad, el receptor de  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ MR) y la glucoproteína epitelial 330 (gp<sub>330</sub>) <sup>(7, 74)</sup>.

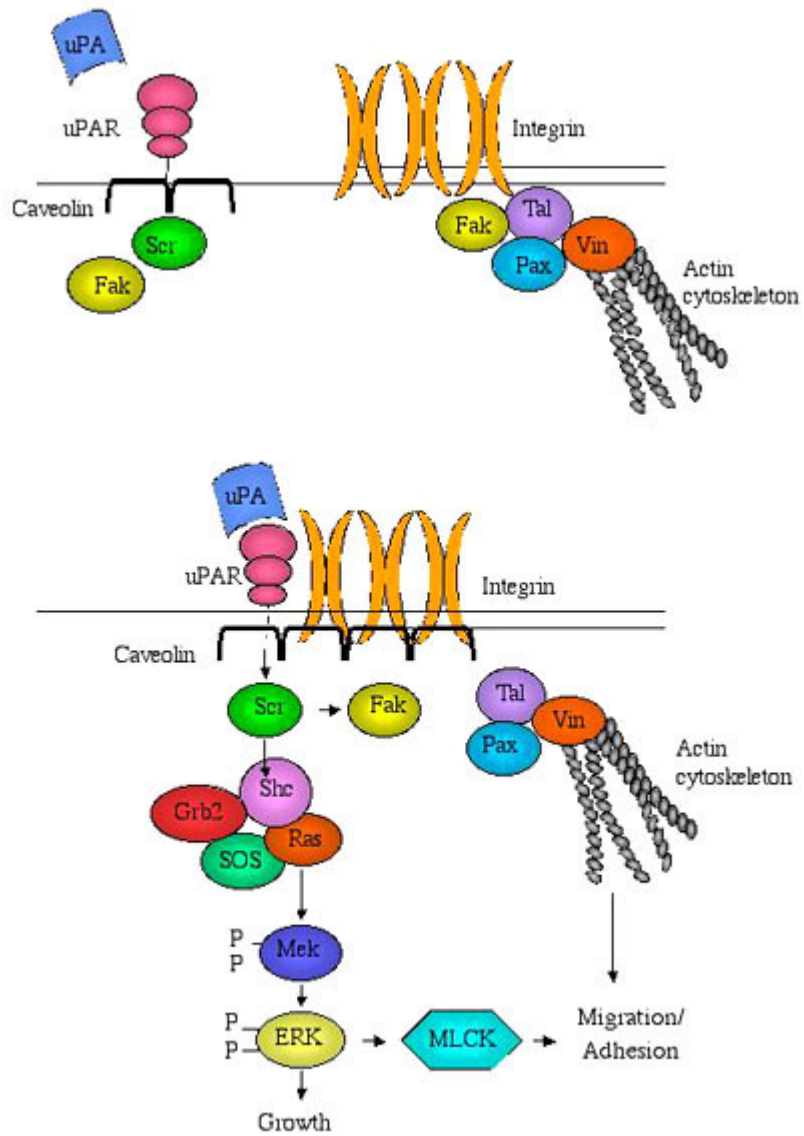
El complejo cuaternario (u-PAR:u-PA-PAI-1: $\alpha_2$ -MR) puede ser internalizado como una unidad, llevado subsecuentemente (u-PA-PAI-1) a los lisosomas, mientras que u-PAR y  $\alpha_2$ -MR son por lo menos en parte reciclados a la superficie celular <sup>(6, 81)</sup>.

### **1.2.c.3. Señales de transducción generadas por u-PAR**

Además de proveer una proteólisis extracelular, la uroquinasa unida a su receptor, activa la señalización intracelular, induciendo rearrreglos del citoesqueleto y redistribución de contactos adhesivos que afectan la adhesión y migración de la célula <sup>(25, 26, 82)</sup>.

El u-PAR unido a su ligando (u-PA/u-PAR) efectúa señales de transducción en la célula por medio de proteínas transmembranales del sistema de tirosin cinasas, produciendo fosforilación de las mismas, generando una señal en el lado citosólico de la célula y actuando como un factor de crecimiento <sup>(25, 26, 76)</sup>.

Estos efectos de señal de transducción se han observado en células en crecimiento, migración y en adhesión <sup>(7, 27)</sup>. Un modelo es ejemplificado en la fig. 11



**Figura 11.** Modelo para uroquinasa activada en una cascada de señalización que dirige a la adhesión, crecimiento y migración, celular. U-PAR esta localizado en la membrana lipídica, los microdominios unidos con caveolin, Src kinases, focal adhesión kinase (FAK) y posiblemente otros componentes; las integrinas son físicamente conectadas a el citoesqueleto a través de una variedad de moléculas, como talina (Tal), paxillin (Pax), and vinculina (Vin), un marcador de adhesión placas. B. Después de que uPA se une a uPAR, el GPI se moviliza y se asocia con las integrinas:, formando un complejo que inicia una cascada de señalización.

La polarización de los receptores de u-PA en las células que migran en un gradiente quimiotáctico es compatible con un señalamiento localizado que afecta regiones discretas de la célula en una organización del citoesqueleto de la misma, esta acción forma parte de un control del movimiento celular, figura 12 <sup>(6, 24)</sup>.

Ambas acciones que son simultáneas con la actividad proteolítica de uPA en la superficie celular completa la acción de la migración celular <sup>(10, 25)</sup>.

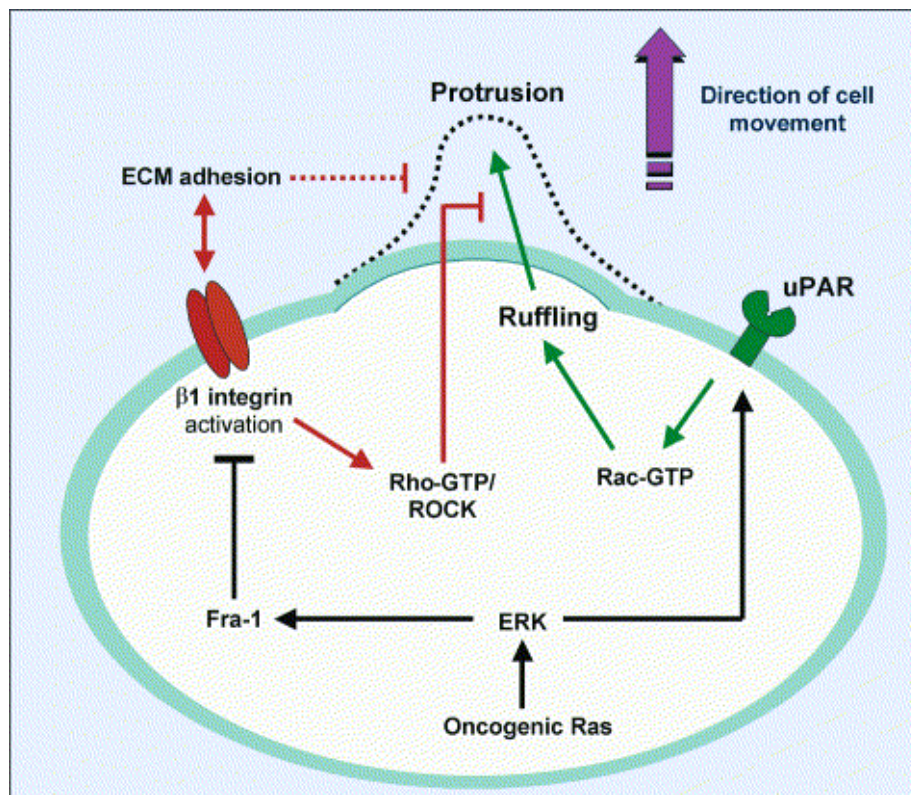


Figura 12. Camino de señalización dependiente-ERK, regula la motilidad <sup>(24)</sup>.

#### 1.2.c.4. Papel de u-PAR

El hecho de que el sistema plasminógeno/plasmina funcione asociado con la superficie de la membrana celular, el receptor de uPA tiene un papel importante en dicho sistema, en particular con la actividad proteolítica que involucra la unión de las proteasas a determinantes celulares que permite en primer lugar tener una acción de tipo parácrina, donde las proenzimas pueden ser sintetizadas y secretadas por unas células pero también sirven para que otras células del tejido adquieran la capacidad de catalizar proteolíticamente en su propio microambiente, como sucede en el caso de espermatozoides que unen u-PA producido por células epiteliales del tracto genital o también de ciertos tumores en los cuales uPAR puede estar presente en las células del tumor mientras que uPA es sintetizado por células del estroma, esto explica la migración celular y la metástasis <sup>(6, 10, 15, 82)</sup>.

Ciertos componentes de la matriz extracelular pueden ser degradados directamente por la plasmina y ciertos zimógenos de la matriz como metaloproteasas que pueden ser activados por la misma plasmina, activando directa o indirectamente su efecto catabólico en la matriz extracelular. Otro tipo de efecto es que los factores de crecimiento pueden ser activados por plasmina y uPAR también incrementa grandemente su activación en las formas latentes y focaliza la acción de dichos factores y restringe su actividad a una población limitada de células o quizá a subdominios de células <sup>(10, 15)</sup>.

El plasminógeno y la plasmina pueden unirse a superficies celulares a través de sitios de unión de lisina en los kringles. La presencia simultánea de pro-uPA, u-PAR, plasminógeno y plasmina en la superficie celular, resulta en la unión de un

sistema muy eficiente de generación de plasmina. En particular la activación de pro-uPA a u-PA es muy acelerado en esta configuración <sup>(6)</sup>.

Mientras la plasmina soluble es rápidamente inactivada por su específica serpina  $\alpha_2$ antiplasmina, al estar asociada con la membrana plasmática se encuentra protegida de su inhibidor macromolecular.

u-PAR es también un receptor de alta afinidad para la proteína de la matriz extracelular, la vitronectina, la cual se une a su vez a integrinas. El sitio de unión a vitronectina es diferente al sitio de unión de uPA, por lo que no compite con él

(25, 82)

#### **1.2.c.5. u-PAR soluble**

Se ha identificado una forma soluble de u-PAR (su-PAR) en el plasma de individuos sanos, mientras que en individuos con algún tipo de cáncer los niveles encontrados son más elevados.

Su-PAR puede ser generado por alternativo splicing del mensajero de u-PAR (m)RNA. Las funciones de su u-PAR son quimioatracción después de hidrolizar entre los dominios 1 y 2 por una proteinasa, incluyendo u-PA, plasmina o quimiotripsina. Actualmente el papel de su-PAR en modular la progresión del cáncer se ha pensado resulta de la limpieza de u-PAR o alternativamente regulando la señalización en la célula <sup>(52)</sup>.

### 1.3. INHIBIDORES SERÍN PROTEASAS (SERPINAS)

El sistema fibrinolítico es regulado por inhibidores de los activadores del plasminógeno, los cuales son también miembros de inhibidores serín proteasas clasificada como una superfamilia SERPINS, (serpin = serín proteasa inhibidor) <sup>(4, 16)</sup>, son proteínas homólogas de un gen ancestral común de cerca de 500 millones de años, en el presente se conocen cerca de 40 diferentes proteínas de esta superfamilia de serpinas originarias de virus, plantas y organismos superiores, las más estudiadas son las encontradas en el plasma humano también como reguladores de procesos inflamatorios aparte del sistema fibrinolítico <sup>(8)</sup>.

Son glucoproteínas pequeñas de cadena sencilla, de más de 350 residuos de aminoácidos, en las que su región carboxi terminal contiene el sitio reactivo P1', el cual es una serín proteasa y los residuos P1 y P2 que determinan la especificidad de la enzima blanco. La reactividad transmitida de la región carboxi terminal se encuentra más bien limitada al exhibirse las secuencias de la región amino terminal<sup>(4)</sup>.

El siguiente sistema es usado para numerar los residuos de aminoácidos de la serpinas: - .....-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3- ..... -COOH, el sitio reactivo es formado por residuos P1 y P1'. Algunas serpinas parece faltarles completamente la habilidad inhibitoria, mientras que otras pueden actuar como inhibidores o sustratos dependiendo de la proteinasa y de las condiciones de la reacción. Cuando actúan como inhibidores forman complejos estables 1:1 con su enzima blanco, figura 13, cuando la serpina actúa como sustrato para la proteinasa, se limita la proteólisis del centro reactivo, el sitio primario de hidrólisis se encuentra dentro del dominio en los

11 residuos aproximadamente, del P10 a P1' donde la posición P1 representa el sitio de hidrólisis de la proteinasa blanco normal. Como resultado de esta hidrólisis, la serpina que posee potencial inhibitorio sufre un mayor cambio conformacional el cual resulta en una significativa estabilización relativa a la serpina no hidrolizada <sup>(16)</sup>.

En cambio las serpinas no inhibitorias (por ejemplo ovoalbúmina y angiotensina) no sufren cambio conformacional o estabilización como resultado de la hidrólisis del centro reactivo <sup>(16)</sup>.

El residuo P1 del centro reactivo es sumamente importante en la especificidad de inhibición así como los sitios secundarios de interacción para una rápida reacción de las serpinas y sus enzimas blanco <sup>(16)</sup>.

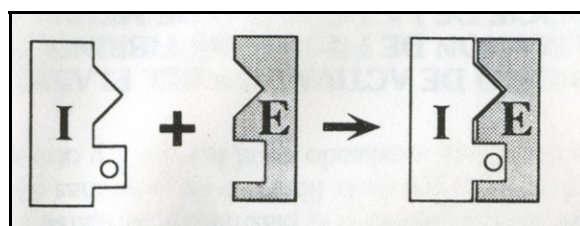


Figura 13. Representación esquemática de la reacción entre una serpina (I) y una serínproteasa (E). Ambas forman un complejo bimolecular, el cual es aparentemente estable por su enlace covalente (éster) entre el átomo de carbono carbonil del residuo localizado en la posición P1 del sitio reactivo de la serpina y el átomo de oxígeno del residuo serina de la proteinasa <sup>(16)</sup>.

Los inhibidores nativos y los hidrolizados proteolíticamente permanecen en la circulación, mientras que los que forman complejos con la enzima son reconocidos por receptores hepáticos y rápidamente eliminados <sup>(4, 14)</sup>.

La molécula nativa existe en forma tensionada o forma S, debido a que el módulo que contiene el centro reactivo se encuentra extendido. La hidrólisis del centro reactivo resulta de una estable separación de los dos residuos hidrolizados (P1-P1') en los polos opuestos de la molécula y toma una forma relajada, forma R. La forma S es favorable como forma estable, complejos en estados intermedios con el blanco proteasa y su hidrólisis cambian a la molécula en una forma inactiva mucho más estable <sup>(4, 8)</sup>.

La inhibición de las serínproteasas por las serpinas, ocurre a través de la interacción del centro catalítico de la proteasa con el sitio expuesto móvil del inhibidor, este sitio reactivo se encuentra en el módulo también llamado región del anzuelo (bait), es usualmente localizada entre el residuo 30 de su carboxiterminal. Es muy importante que la secuencia de aminoácidos sea conservada, cualquier alteración a lo largo del centro activo de la serpina altera su reactividad y también la especificidad de su blanco proteasa <sup>(8)</sup>.

La interacción de la serpina con su blanco proteasa puede seguir 2 caminos como se muestra en la figura 14, uno de sustrato y otro como suicida. En el primero la serpina actúa como un sustrato y la reacción se procesa según los lineamientos de la serín proteasas y su sustrato genuino. La Enzima y la serpina forman un complejo de Michaelis con uniones de hidrógeno que es convertido en un intermediario tetraédrico metal estable, en seguida se forma un complejo acil-enzima, que consiste de un enlace ester entre la unión del grupo carboxi del residuo P1 de el inhibidor y el grupo hidroxil del residuo serina de la proteasa. Finalmente vía un segundo complejo tetrahédrico, se genera una serínproteasa activa y una serpina



hidrolizada. El segundo camino (suicida) los principios son idénticos para el camino de sustrato, solo que el complejo serpinproteasa es virtualmente capturado en algún punto, la serpina hidrolizada es muy poca y, consecuentemente, en vivo estos complejos son usualmente eliminados antes de que ocurra la hidrólisis completa de la serpina <sup>(8)</sup>.

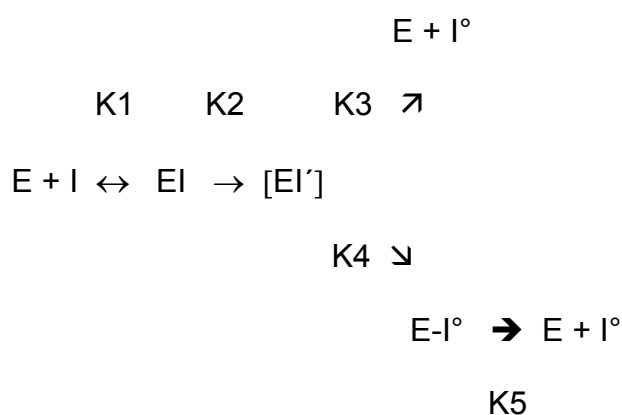


Figura 14. Caminos que puede seguir una serpina con su serín proteasa

El inhibidor (I) forma un complejo reversible (EI) con su blanco serín proteasa (E) con una constante bimolecular K1. Este complejo reversible puede disociarse en sus componentes con una constante K1. Consecutivamente, un intermediario (EI') se forma, este puede transformarse en un complejo estable E-I<sup>o</sup>, con una constante K4, o puede reaccionar de acuerdo a un camino de sustrato resultando una enzima libre y un inhibidor hidrolizado (I<sup>o</sup>), hidrólisis entre los residuos P1-P1' del centro reactivo. Finalmente, un complejo bimolecular estable E-I<sup>o</sup> puede disociarse con una constante K5 en una enzima libre y un inhibidor inactivo hidrolizado (I<sup>o</sup>), posiblemente esta reacción final en vivo no ocurre considerablemente ya que los complejos son capturados antes de llegar al final de la reacción <sup>(8)</sup>.

### 1.3.a. PAI-1

El mayor inhibidor del activador del plasminógeno en el plasma es el PAI-1<sup>(4)</sup>, es una glucoproteína 50 KD<sup>(8)</sup> que es secretada por las células endoteliales y por el hígado que circula en el plasma como un complejo equimolecular 1:1 unido a t-PA, u-PA o reversiblemente unido a vitronectina, una proteína acarreadora y que estabiliza su actividad<sup>(4)</sup>.

El PAI-1 se encuentra en mayor concentración como constituyente de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, su principal reservorio en las que se encuentran 4000 a 8000 moléculas por plaqueta, 100 a 200 ng/mL de sangre, mientras que en el plasma libre se encuentra alrededor de 10 ng/mL. En condiciones no patológicas PAI-1 se encuentra en las células endoteliales de venas y arterias y su síntesis va ligada para formar parte de la matriz subendotelial para controlar la activación del plasminógeno dependiente de procesos extravasculares, lo que explica su baja concentración plasmática y su rápida eliminación por el hígado<sup>(8)</sup>.

El PAI-1 reacciona con el t-PA de cadena doble o sencilla y con u-PA de cadena doble. PAI-1 es incapaz de inhibir a t-PA unido a fibrina, pero puede inhibir eficientemente a u-PA de cadena doble unido a membranas celulares<sup>(4)</sup>.

PAI-1 interacciona con vitronectina, heparina, fibrina y serínproteasas<sup>(8, 18)</sup>

La Interacción de PAI-1 con: vitronectina, (es una glucoproteína que se encuentra como una proteína dimérica en el plasma), se propone que la vitronectina y PAI-1 se enlazan 1:1 estequiometricamente, el sitio de enlace de la vitronectina es en la mitad de la región amino terminal de la proteína, mientras que el inhibidor no se

sabe ciertamente cual es su sitio de enlace con la vitronectina. Al unirse con PAI-1 este aumenta su estabilidad en su forma activa <sup>(8)</sup>.

La vitronectina actúa obligatoriamente como un cofactor para la inhibición de trombina por PAI-1 pero en contraste con el efecto de vitronectina, heparina no incrementa la estabilidad de PAI-1, media la aceleración de la inhibición de trombina por PAI-1, esto tiene gran significado en la regulación de procesos proteolíticos en la matriz extracelular <sup>(8)</sup>.

El enlace de PAI-1 con la fibrina polimerizada es específica, reversible y saturable. Los diferentes sitios de unión para PAI-1 con la fibrina se encuentra entre los aminoácidos 110 y 145 y entre 284 y 294, este último es exclusivo para unirse a fibrina mientras que la primera puede unir vitronectina y otras serán proteasas como t-PA, u-PA y trombina. La existencia de estos sitios de unión múltiple para t-PA y fibrina implica un modelo que describe la secuencia de eventos durante los estados iniciales de la fibrinólisis. Este modelo propone que t-PA media la activación del plasminógeno en presencia de fibrina y el papel de la fibrina unida a PAI-1. Bajo condiciones de exceso de PAI-1 unido a fibrina, el coágulo es protegido de la degradación en virtud de estar capturado de la fase líquida t-PA por PAI-1. La interacción de t-PA con PAI-1 unido a fibrina causa una rápida disociación de PAI-1 y forma complejos inactivos t-PA/PAI-1. Se ha creado la hipótesis de que estos complejos disociados de la fibrina son debidos a una competencia entre t-PA y fibrina por el sitio de unión de PAI-1. Estos complejos inactivos unidos a fibrina por un dominio de t-PA compite con t-PA libre y la unión de estos complejos previene la generación subsecuente de plasmina <sup>(8)</sup>.

Bajo condiciones de exceso del activador, el inhibidor se puede agotar resultando unión del activador libre a la fibrina, esta unión captura plasminógeno de la fase fluída que es convertido en plasmina. La plasmina genera lisinas carboxi terminales activando sitios de unión del plasminógeno a la fibrina que después une t-PA de la fase fluída. La unión de plasminógeno a fibrina resulta en un cambio conformacional que convierte muchos sustratos para t-PA. La hidrólisis de fibrina por la plasmina remueve PAI-1 unido a fibrina causando una aceleración en la fibrinólisis. Este PAI-1 proveniente del trombo rico en plaquetas unido a fibrina es una eficiente localización para inhibir la fibrinólisis y proteger una lisis del trombo prematuramente. La trombina tiene una doble función en la hemostasis, aparte de ser una enzima de la coagulación actúa también como agente antifibrinolítico que activa las plaquetas y libera localmente PAI-1 dentro del trombo <sup>(8)</sup>.

Bajo este criterio trombina es también una serín proteasa blanco de PAI-1 en la presencia de vitronectina y la aceleración de la reacción se debe al incremento de afinidad de la trombina al complejo PAI-1/Vitronectina, trombina, PAI-1 y vitronectina forman complejos ternarios no covalentes y complejos binarios equimoleculares entre t-AP y PAI-1. La trombina y vitronectina ocupan distintos puntos de unión entre los amino ácidos 110 – 145 en PAI-1 permitiendo la formación de dichos compuestos <sup>(8)</sup>.

La interacción de PAI-1 con serínproteasas,. Los dos activadores del plasminógeno son serínproteasas de PAI-1 que son rápidamente inactivadas, en este evento los sitios de interacción entre el y t-PA son el centro P1 en el residuo arginina <sub>346</sub> de PAI-1 y el centro catalítico serina <sub>478</sub> de t-PA, entre la región 110-145 de PAI-1 y un dominio no conocido de t-AP y entre un dominio cargado positivamente en PA-1

localizado entre los residuos  $\text{lis}_{296}$  y  $\text{glu}_{302}$  en la proteasa de t-AP y en una región cargada negativamente de PAI-1 <sup>(8)</sup>.

El mecanismo de acción de PAI-1 según el esquema de reacción de las serpinas, entre los dos caminos puede ser modulado por la trombina, al formarse el complejo trombina/PAI-1 el inhibidor es hidrolizado pobremente, por lo que respecta a t-PA y u-PA se estipula que sigue el camino suicida en la que PAI-1 es hidrolizado proteolíticamente <sup>(8)</sup>.

### **1.3.b. PAI-2**

Un segundo inhibidor del activador del plasminógeno es PAI-2. Es un polipéptido de peso molecular de 46 600 Da <sup>(9, 93)</sup>.

Por sus características se encuentra agrupado dentro de la subfamilia de ovalbúmina, Ov-serpinas; en esta familia se encuentran incluidas también Maspin, el producto de un gen tumoral supresor, el antígeno de células de carcinoma escamoso SCCA-1 y SCCA-2, inhibidor de la elastasa neutrófila y el inhibidor de la trombina placentaria o P1-6 entre otros de importancia <sup>(9, 93)</sup>.

PAI-2 es la única que se caracteriza por existir en ambas formas, secretada y citosólica, la forma intracelular de bajo peso molecular y la secretada de alto peso molecular <sup>(17)</sup>; juega un papel integral en la regulación del activador del plasminógeno tipo uroquinasa y del activador del plasminógeno tipo tisular, cuya actividad con el primero se ha caracterizado en la remodelación tisular, y el segundo en la fibrinólisis. PAI-2 también puede controlar eventos en la proteólisis intracelular unido a estructuras celulares y tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria y en la

apoptosis así como en la diferenciación y migración celular, como se muestra en la Figura 15, <sup>(9, 13, 17)</sup>.

PAI-2 es una molécula alfa globulina, existe en dos formas moleculares 47 y 60 KD las cuales difieren solamente en su grado de glucosilación, PAI-2 no glucosilado es más abundante y solamente es detectado intracelularmente mientras que la forma glucosilada es la forma secretada, la proteína es glucosilada en tres sitios y posee su centro reactivo en arginina<sub>380</sub> y treonina<sub>281</sub> <sup>(9, 12, 93)</sup>.

Datos fisicoquímicos han indicado que ambas formas inhiben eficientemente a u-PA y t-PA de doble cadena y reacciona muy pobremente con t-PA de cadena sencilla. Cuando t-PA se une a fibrina es protegida de PAI-2, su función principal es inhibir u-PA en el espacio extravascular y tiene una menor función en controlar t-PA en el proceso de fibrinólisis <sup>(9, 12)</sup>.

PAI-2 se une irreversiblemente a su blanco proteasa, es hidrolizado proteolíticamente actuando como un sustrato suicida <sup>(9, 12)</sup>.

PAI-2 está asociado con múltiples procesos biológicos como se muestra en la figura 15, bajo condiciones normales PAI-2 se encuentra en niveles bajos de detección en el plasma o suero, sin embargo se incrementa marcadamente durante el embarazo; se ha observado en líquido amniótico y plasma del cordón umbilical; en este estado es de origen fetal y es sintetizado por las vellosidades del epitelio sincitiotroblástico. También se han demostrado valores altos en pacientes con leucemias mielomonocítica, monocítica aguda y en niños con linfoma <sup>(9)</sup>.

PAI-2 es sintetizado por monocitos, macrófagos, leucocitos y queratinocitos, endotelio vascular, células de la granulosa de estados normales <sup>(9, 13)</sup>.

En procesos malignos se ha identificado en expresión alterada, más notablemente en carcinomas de pulmón y de mama principalmente, y entre otros como tumores endometriales y gástricos, por lo que se le ha querido utilizar como un marcador tumoral. En estudios realizados en carcinomas de mama de pacientes con nódulos negativos, los niveles elevados se han asociado con buen pronóstico y sobrevivencia libre de la enfermedad, mientras que niveles bajos asociados al tumor han demostrado corto relapso y posible metástasis <sup>(9, 13, 93, 110)</sup>.

La plasmina generada en la superficie de las células migratorias facilita la degradación de la matriz extracelular en estados normales y patológicos, la unión de u-PA (pro-u-PA) al receptor inicia y potencializa la formación de plasmina en la superficie celular; esta plasmina unida a la superficie celular es protegida de la inhibición de alfa 2 antiplasmina que restringe la proteólisis en la superficie celular. PAI-2 inhibe el receptor unido a u-PA de cadena doble eficiente y completamente. También puede unirse al receptor soluble y unido a u-PA de cadena sencilla regulando la proteólisis en la superficie celular <sup>(9)</sup>.

Los complejos u-PA/PAI-2 unidos al receptor de u-PA son hidrolizados en 2 fragmentos, uno de 70 KDa el cual contiene el sitio activo de u-PA y PAI-2 y otro de 22 KDa representando la porción amino terminal de u-PA el cual se une al receptor, ambos fragmentos permanecen unidos a la superficie celular; el fragmento de 70 KDa es endocitado o liberado mientras el otro fragmento pequeño permanece unido a la célula previniendo que se una otro u-PA intacto <sup>(9)</sup>.

PAI-2 es un importante componente de la respuesta inflamatoria, su biosíntesis y secreción obedecen a respuesta de endotoxinas, y mediadores

inflamatorios como TNF, IL-1 e IL-2. El centro reactivo de PAI-2 está desprovisto de metionina proporcionando una resistencia a la inactivación por oxidantes liberados de los neutrófilos; continuando con su actividad inhibitoria durante la inflamación y contribuyendo al desplazamiento y mantenimiento de la fibrina durante estas reacciones como se requiera <sup>(9)</sup>.

Su localización intracelular le da un papel citosólico independiente de la inhibición de uroquinasa. PAI-2 muestra similaridad con CrmA, una serpina viral que inhibe IL-1, convirtiéndola en una enzima (ICE), un potente inductor de apoptosis en muchos sistemas celulares, por lo que se ha sugerido que puede interactuar con dicha enzima o proteasas relacionadas. El sistema del plasminógeno activamente participa en los procesos de reparación de heridas cutáneas, muchos componentes en la cascada de activación del plasminógeno son detectados en los queratinocitos, con la posibilidad de que PAI-2 es el principal modulador de la proteólisis intracelular en estas células <sup>(9)</sup>.



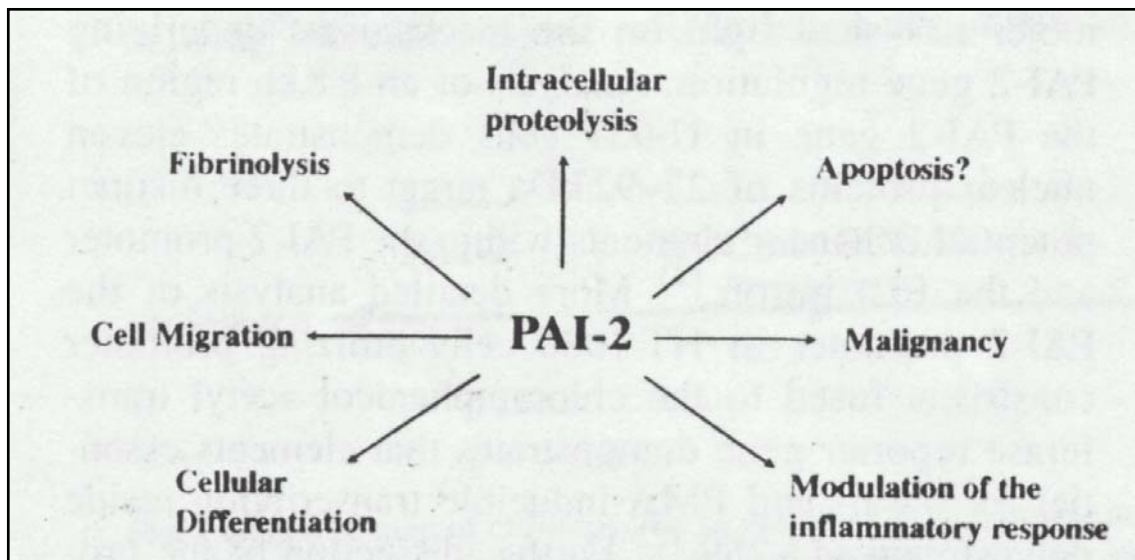


Figura 15. PAI-2 asociado con múltiples procesos biológicos <sup>(9)</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, PAI-2 es expresado en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo, la expresión de su gen es influido por numerosos agentes, el promotor tumoral, factores de crecimiento, citocinas, AMPc, agentes vasoactivos, toxinas, hormonas esteroides, como se muestra en la figura 1, por lo que el mecanismo de regulación de la expresión del gen es muy complejo <sup>(9, 93)</sup>.

La regulación de la expresión de PAI-2 abre un camino más en la terapéutica de procesos en los que participa.

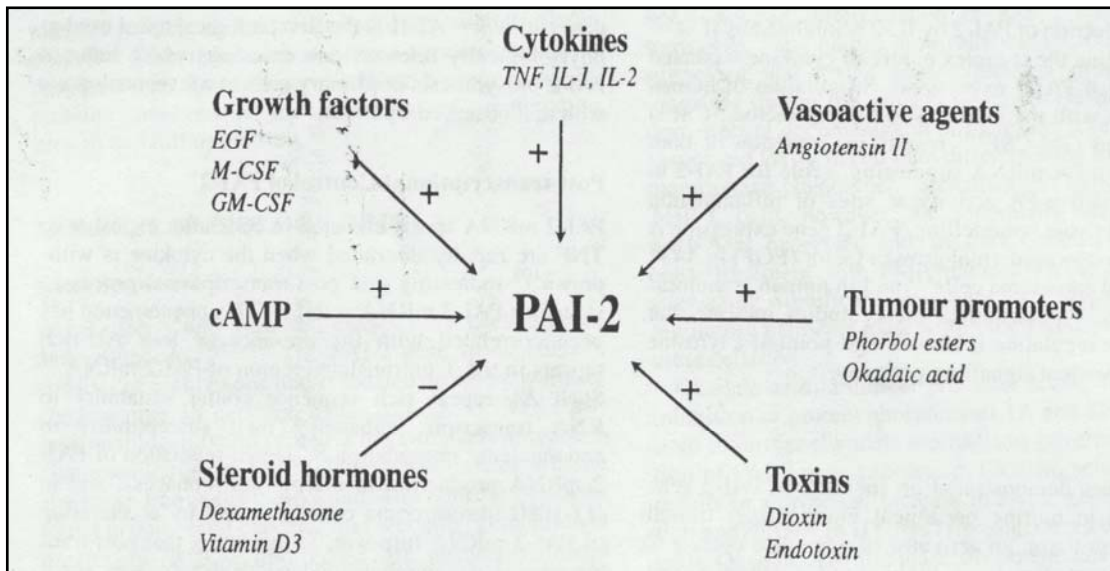


Figura 16. Agentes que influyen la expresión del gen de PAI-2 <sup>(9)</sup>.

### 1.3.c. Inhibidores de la Plasmina

**1.3.c.1.  $\alpha_2$ -antiplasmina** es el inhibidor de la plasmina en fase líquida. Es una glucoproteína de cadena sencilla, de peso molecular de 70 KD, ( Mr 70 000 ), su concentración plasmática es de 1  $\mu$ M (70 mg/dL ). Se sintetiza en el hígado y su vida media es de 3.3 días. Tiene tres propiedades funcionales mayores:

1. reacciona con la plasmina en una reacción de segundo orden, para formar un complejo estequiométrico 1:1; este complejo desaparece de la circulación en 0.5 días.
2. Interfiere con la adsorción del plasminógeno a fibrina.
3. Tiene sitios de unión específicos para plasmina y fibrina.

En la unión con la primera su alto rango de inhibición es el resultado de un doble sitio de interacción entre la región carboxi terminal de la alfa 2-antiplasmina y los

sitios de unión de la lisinas, LBS, del kringle 1 y los sitios reactivos de ambos la enzima y el inhibidor. Cuando los LBS de los kringles en la plasmina están ocupados por los residuos de lisina en la fibrina o las membranas celulares, la plasmina unida no puede unirse a  $\alpha_2$ -antiplasmina y ser inhibida. La inhibición de la plasmina en solución por  $\alpha_2$ -antiplasmina restringe la generación de plasmina a la forma glu y dificulta más la degradación de la superficie, controlando la extensión de la fibrinólisis <sup>(3)</sup>.

El sitio de entrecruzamiento de  $\alpha_2$ -antiplasmina con fibrina es Glu<sub>2</sub>, muy cerca de la región amino terminal; dicho entrecruzamiento se establece por acción del factor XIIIa, que cataliza una unión glutamil-lisina entre el Glu<sub>2</sub> de la  $\alpha_2$ -antiplasmina y la lisina del carboxi terminal de la cadena  $\alpha$  de la fibrina estableciendo un enlace covalente. Entonces la  $\alpha_2$ -antiplasmina tiene 3 sitios funcionales: el sitio de unión LBS, el sitio de entrecruzamiento y el sitio reactivo <sup>(3, 40)</sup>.

**1.3.c.2.  $\alpha_2$ -macroglobulina** otra serpina que inhibe a la plasmina en caso de falta de  $\alpha_2$  antiplasmina, es una proteína dimérica de peso molecular 725 KD. Está formada por 4 subunidades idénticas de 185 kD, unidas por puentes disulfuro. Cada unidad contiene una secuencia específica de aminoácidos región bait, que es susceptible a hidrólisis. Cuando esto sucede por acción de proteasas, se produce un cambio conformacional de la molécula, que se traduce en una unión irreversible de la enzima sin bloqueo del sitio activo. Este mecanismo de inhibición es conocido bajo el nombre de trampa molecular. Es producida por el hígado, se encuentra en el plasma su vida media es de 135 – 180 horas, su acción se ejerce sobre todas las

proteasas (carboxi, metalo, serino, tiol, etc.), los complejos son depurados rápidamente del plasma, la concentración plasmática es de 2.5 g/L, también inhibe a la calicreina <sup>(44)</sup>.

**1.3.c.3. Inhibidor de C1.-** Es una glucoproteína con peso molecular 105 000; se encuentra en el plasma en una concentración de 0.2 g/L y es capaz de inhibir la calicreina plasmática, los factores XIIa, XIa y C1 <sup>(44)</sup>, es una glucoproteína rica en Histidina (HRG). Es un inhibidor del plasminógeno debido a su alta afinidad por el LBS del mismo, por lo tanto reduce la unión del plasminógeno a la fibrina <sup>(40)</sup>.

#### **1.4. OTROS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO**

En adición a los activadores del plasminógeno y los inhibidores del sistema, éste también es regulado por la unión a proteínas o receptores.

Además del receptor para uroquinasa que ha sido bien definido, se han descrito diferentes receptores para t-PA. t-PA parece ser depurado por el hígado por diferentes mecanismos, uno de ellos dependiente de glucosilación de t-PA y definido como receptor de manosa; otro dependiente de unión de estructuras en la molécula de t-PA cerca de su estructura EGF y del finger y un mecanismo de receptor a través del cual el t-PA forma un complejo con PAI-1 y es removido de la circulación; este último parece estar relacionado con las lipoproteínas (LRP); este receptor relacionado a proteína, también se encuentra además del hígado en las células endoteliales y otras células como los fibroblastos. LRP es capaz de enlazar complejos como t-PA/PAI-1 y u-PA/PAI-1, lactoferrina, virus y componentes del metabolismo de lípidos como Lp(a). La unión de estas sustancias al receptor es

seguida por captación dentro de la células e inducción de una respuesta en la célula incluyendo aumento en la síntesis de PAI-1 <sup>(40)</sup>.

Todos los receptores para el plasminógeno parecen jugar un papel en la regulación de la fibrinólisis, sus características se muestran en la tabla 3 <sup>(4)</sup>.

Receptores	MW	Amino ácidos	Ligandos	Acción
Plasminógeno	37.45		K1, K4	Celular LBS
u-PA (glu)	55-60	313	EGF	GPI
(no glu)	35			Activa u-PA
t-PA 1	40		EGF	Activa t-PA
t-PA II	175		Manosa	Depura
LRP(cadena $\alpha$ )	515	4525	$\alpha$ 2MRAP complejos	Depura
LRP (cadena $\beta$ )	85		(t-PA-PAI $\alpha$ 2M-proteasa)	Depura
SEC			$\alpha$ 1-PI elastasas	Regula la síntesis de serpinas

Tabla 3. Receptores en el sistema fibrinolítico <sup>(4)</sup>.

Glu-glucosilado, no glu (no glucosilado), GPI- glucosil fosfatidil inositol, LRP LDL receptor relacionado a proteína, SEC complejo receptor enzimático serina,  $\alpha$ 2MRAP- receptor  $\alpha$ 2 macroglobulina asociado a proteína.

### 1.5. FUNCIONES NO PROTEOLITICAS DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO

Los componentes del sistema de activación del plasminógeno están asociados a otras moléculas presentes en la superficie celular o en la matriz extracelular, las cuales propagan otras funciones diferentes a la actividad proteolítica (figura 17).

**1.5.a. Vitronectina.** Es una glucoproteína de 78 KDa , que contiene un dominio somatomedina B, una secuencia de unión a integrinas RGD, una región que une a colágeno y dos dominios hemopexin <sup>(29)</sup>. Esta glucoproteína es primeramente una proteína plasmática, la cual es depositada extravascularmente en la ECM durante daño y reparación <sup>(29, 83)</sup>. La vitronectina plasmática tiene forma cerrada mientras que la depositada en la ECM es extendida. Los receptores de la superficie celular de la familia de las integrinas, especialmente los que contienen cadenas  $\alpha v$  (por ejemplo:  $\alpha v\beta 1, 3$  y  $5$ ) se unen a la secuencia RGD <sup>(28, 81)</sup>.

La unión de vitronectina a los elementos del sistema del plasminógeno tiene mucha importancia en su activación, u-PAR se une a vitronectina dentro de sus dominios 2 y 3 al dominio somatomedina B de la misma, para una eficiente unión se requiere u-PAR intacto y dicha unión es aumentada por la presencia del complejo u-PA:u-PAR; este aumento de adhesión de u-PAR a vitronectina es independiente de la actividad proteolítica de u-PA <sup>(25, 83, 84)</sup>.

PAI-1 en su forma nativa se une a vitronectina y este enlace estabiliza el inhibidor, protegiéndolo de convertirse en su forma latente. El sitio de unión a vitronectina compite con u-PAR e integrinas, por lo que PAI-1 bloquea la interacción con ellas <sup>(25)</sup>. La distribución de PAI-1 en el espacio extracelular es casi siempre unida a vitronectina <sup>(70, 82)</sup>.

La interacción de u-PA a vitronectina es en el dominio hemopexina de vitronectina y el fragmento N terminal de u-PA.

**1.5.b. Integrinas.-** son receptores transmembranales heterodiméricas compuestas de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  las cuales se encuentran unidas a las proteínas de la ECM tales como vitronectina, colágenos, fibrina, laminina y fibronectina

(27, 28, 30, 31). Estos receptores median la adhesión de células a la ECM por medio de la molécula RGD y no RGD interacciones con proteínas de señalización intracelular y elementos del citoesqueleto celular. La unión a sus ligandos es reversible, la activación se caracteriza por cambios conformacionales en los dominios extracelulares, reorganización de conexiones intracitoplásmicas (actina-citoesqueleto) y redistribución de integrinas en la superficie celular (26, 27, 28).

La asociación de u-PAR con varios miembros de la familia de las integrinas y su habilidad para inducir su activación indican las funciones adicionales para el sistema de activación del plasminógeno. En la sección 3.4 se discute como u-PAR puede modular las funciones de las integrinas para producir en sitios específicos protelisis y utilizar los dominios intracelulares de las integrinas como señales de transducción

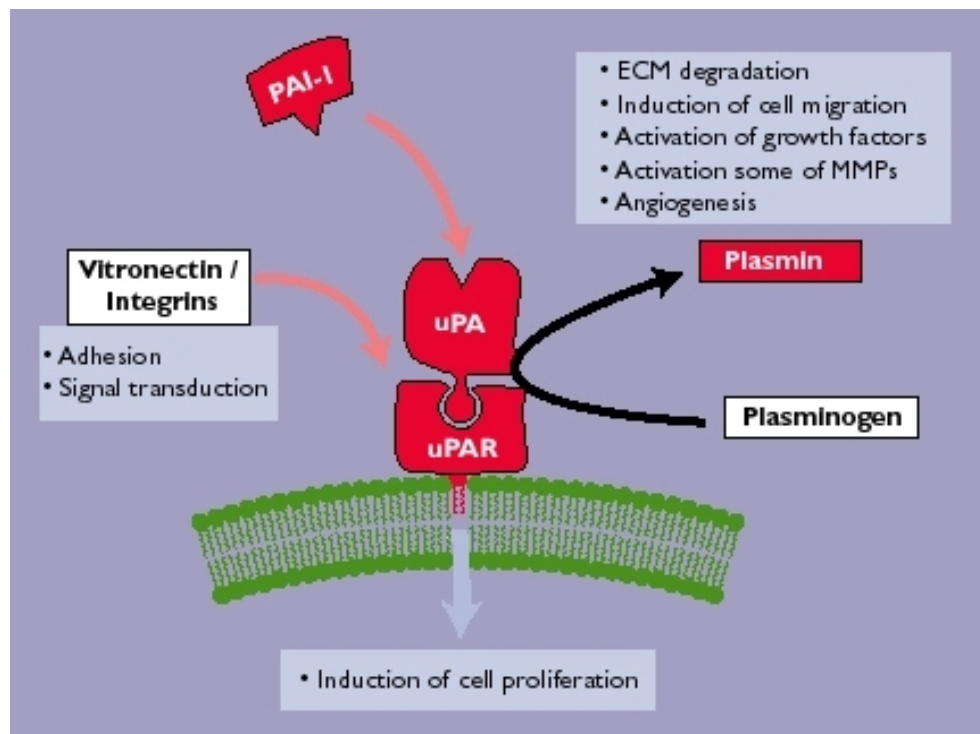


Figura 17 Funciones no proteolíticas del Sistema de Activación del Plasminógeno

### 1.5.c. Interacción con moléculas de señalización

Como se indicó antes, u-PAR transmite señales intracelulares a pesar de la falta de una estructura transmembranal, pues sólo posee su receptor de anclaje GPI. La unión de u-PA al receptor promueve señales independientes de su actividad proteolítica en la superficie celular. Esta actividad es mediada por proteínas adaptadoras como las integrinas <sup>(26, 27, 28, 30, 31)</sup>, calveolin y proteínas G acoplada a receptor (GPCR) así como otros mediadores menos definidos tales como  $\alpha_2$ MR/LRP y manosa-6-fosfato/receptor insulina factor de crecimiento II.

El complejo u-PA/u-PAR/adaptador, modula varios caminos de señalización en la célula, los cuales son ligados a cinasas tales como tirosin cinasas, serina/treonina



quinasas y proteína cinasa C, cinasas de adhesión focal (FAK), ERK/STAT <sup>(22, 24)</sup>, familia Src y Jak/STAT <sup>(20,21)</sup>, de igual manera que movilización de calcio intracelular, adicionalmente a elementos del citoesqueleto tales como vinculina y actina <sup>(25)</sup>.

Estos caminos de señalización regulan las funciones proteolíticas y no proteolíticas del sistema del plasminógeno tales como adhesión celular, quimiotaxis, proliferación diferenciación y endocitosis <sup>(20 - 25)</sup>.

#### **1.5.d. Familia de Receptores de Lipoproteína de baja densidad (LDRL)**

Se conocen seis receptores de esta familia que median endocitosis de varios tipos de ligandos,  $\alpha_2$ MR/LRP, gp<sub>330</sub>, megalin, VLDLR específicamente median endocitosis de los componentes del sistema del plasminógeno <sup>(14, 19)</sup>. El complejo u-PAR:u-PA:PAI-1 es rápidamente internalizado y degradado en lisosomas en un proceso mediado por estos tres receptores, así mismo PAI-1 media la unión de tPA a  $\alpha_2$ MR/LRP y gp<sub>330</sub> <sup>(14, 74, 75, 82)</sup>. La endocitosis del complejo u-PA:PAI-2 es mediado en parte por LDLR, sin embargo intervienen también los otros receptores funcionando como mediadores.

## 1.6. MECANISMO DE ACTIVACION DEL PLASMINÓGENO

### 1.6.a. Focalización de proteínas fibrinolíticas en la superficie de la fibrina o membranas celulares

La fibrina es un polímero insoluble que constituye el soporte físico del coágulo y funciona como un cofactor suicida durante el proceso de fibrinólisis. Al formarse el coágulo en el espacio intravascular, el plasminógeno y el t-PA se fijan a la superficie de la fibrina, el plasminógeno se fija por medio de sus módulos kringles 1 y 4 por medio de los sitios de unión a la lisina LBS y el t-PA por su módulo finger. Estos sitios de unión de la fibrina no están presentes en el fibrinógeno, su precursor soluble<sup>(3)</sup>.

**1.6.a.1. El Fibrinógeno** es una molécula compleja compuesta por 3 pares de cadenas polipeptídicas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ , y  $\gamma$ ), 2 unidas por puentes disulfuro y organizadas en una estructura trinodular. Las regiones aminotermiales forman el módulo central E a los extremos del cual se encuentran las regiones nodulares D (D-E-D), ver figura 18, <sup>(43)</sup>.

La región E contiene los fibrinopéptidos A (cadena  $\alpha$ ) y B (cadena  $\beta$ ) que al ser hidrolizados por la trombina permiten la formación del polímero de fibrina y la exposición de los sitios de fijación para el t-PA y el plasminógeno <sup>(3)</sup>.

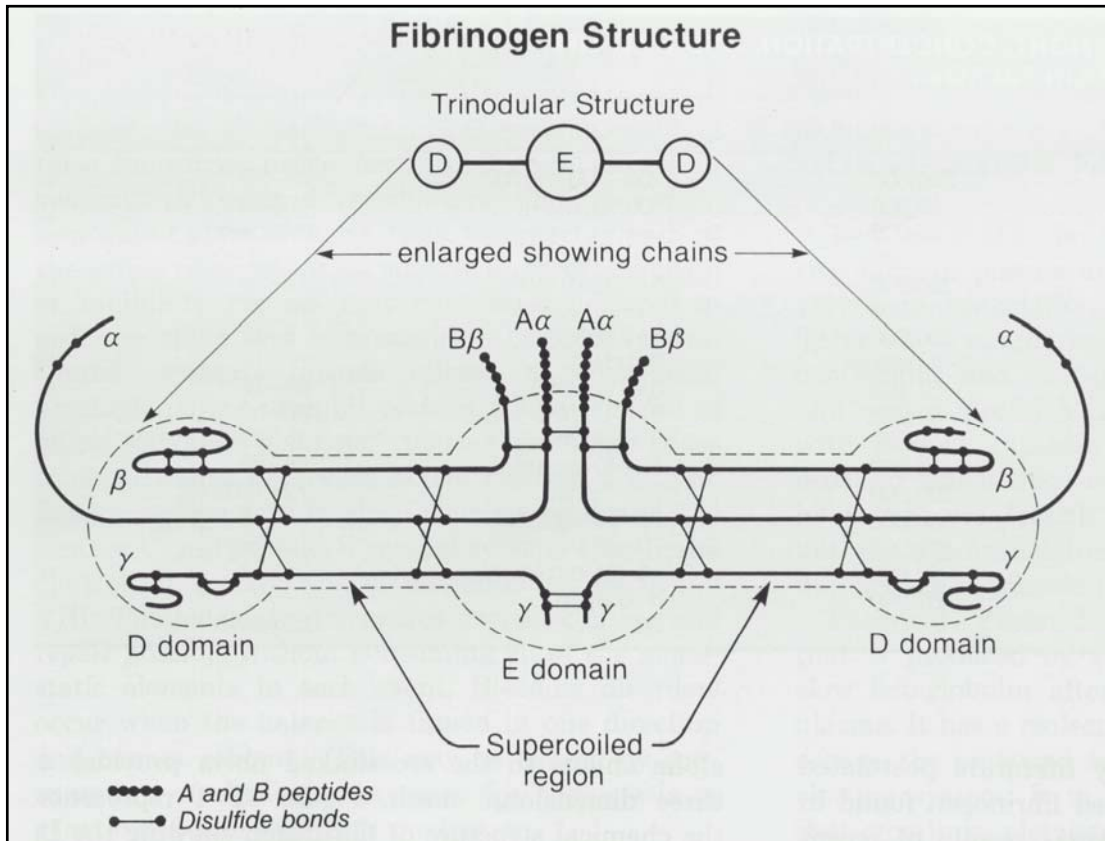


Figura 18. Estructura del Fibrinógeno <sup>(43)</sup>

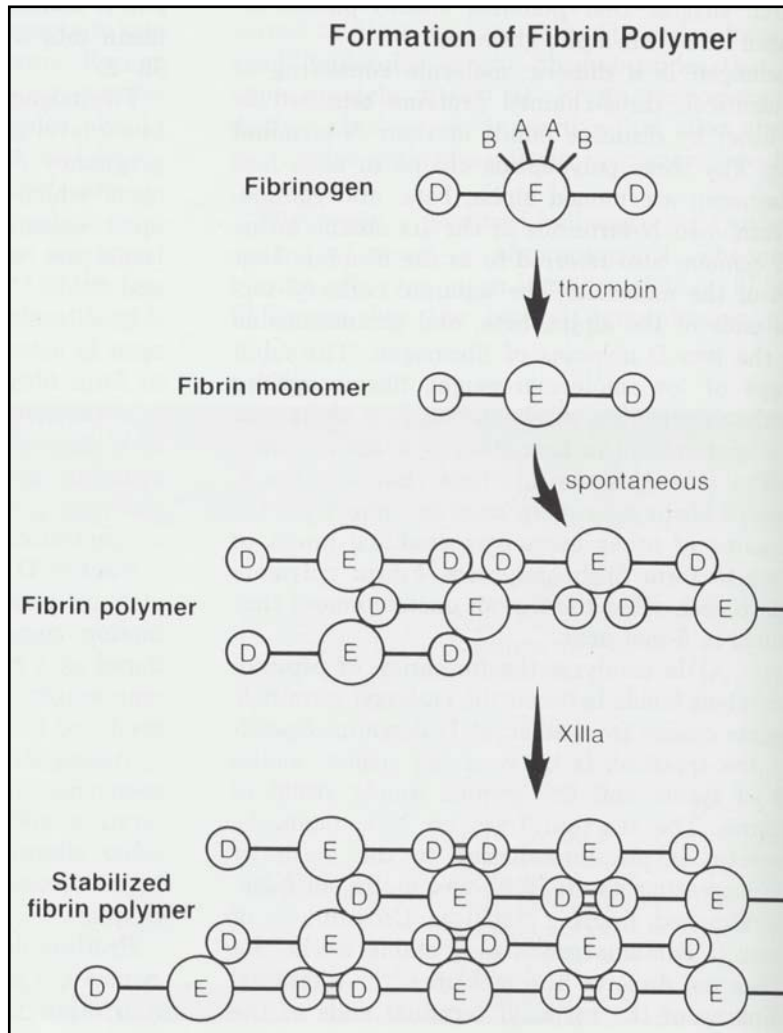


Figura 19. Fibrinógeno y polimerización de la fibrina <sup>(43)</sup>

La hidrólisis de las cadenas alfa y beta de la región E del monómero de fibrina tienen una afinidad por las regiones D de otros monómeros estableciendo una unión entre ellos y formando un polímero. Figura 19.

El factor XIIIa cataliza las uniones covalentes entre las cadenas gamma carboxi terminales de los dominios D adyacentes <sup>(3)</sup>. Específicamente entre el grupo amino epsilon de la lisina y el grupo amida gamma de la glutamina, la reacción libera una

molécula de  $\text{NH}_2$ . La fibronectina también es incluida en la red por el factor XIIIa aumentando su estabilidad y  $\alpha_2$ -antiplasmina es importante para limitar la lisis del coágulo <sup>(43)</sup>.

Este entrecruzamiento de dominios D adyacentes produce un coágulo estable de fibrina.

El sitio de unión con el t-PA está localizado en la región D-dimérica en una secuencia que interactúa con el módulo finger del t-PA. La fijación del plasminógeno a la fibrina pone en juego interacciones entre los LBS de los kringles 1 y 4 y los residuos de lisina expuestos en posición carboxi-terminal por la plasmina. Se constituye así un complejo trimolecular en el seno del cual la actividad catalítica del t-PA es óptimamente estimulada; la plasmina es de este modo formada directamente en la superficie de la fibrina y es precisamente esta reacción de superficie que define la eficacia y la especificidad del sistema; por un lado la actividad del t-PA es prácticamente nula en ausencia de fibrina y por otro lado, la plasmina, una serina proteasa de amplio espectro. Cuando es formada *in situ* en la superficie de la fibrina, está protegida de los inhibidores plasmáticos y posee como actividad prácticamente exclusiva, la degradación de la fibrina, que permitirá la disolución del coágulo, sin producir fibrinogenolisis. Al disolverse el coágulo, la plasmina es liberada a la circulación en donde es rápida y eficazmente inhibida por la  $\alpha_2$ -antiplasmina, evitando que esta actúe sobre otras proteínas del plasma, en particular sobre el fibrinógeno y contribuye a la especificidad del proceso fibrinolítico. Más aún la actividad inhibidora de  $\alpha_2$ -antiplasmina circunscribe la reacción de activación a la

transformación de Glu-plasminógeno en Glu-plasmina, ya que impide la generación de las formas Lis-plasminógeno o Lis-plasmina. Bajo condiciones fisiológicas no existe generación de formas Lis y la enzima fibrinolítica activa es la Glu-plasmina <sup>(3)</sup>.

La producción localizada de plasmina en la superficie del coágulo conduce a la degradación progresiva de la superficie de la fibrina y a una fase de amplificación aceleración del proceso fibrinolítico <sup>(3)</sup>.

### 1.7. AMPLIFICACIÓN Y ACELERACIÓN DE LA FIBRINOLISIS

La secuencia de eventos moleculares responsables de la fase de aceleración de la fibrinólisis se encuentran esquematizados en la figura 20

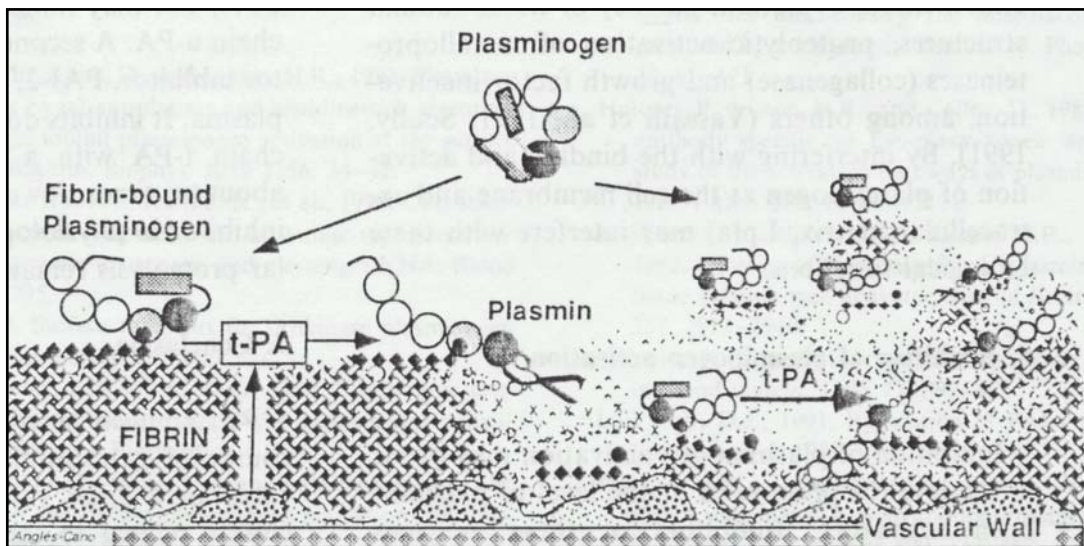


Figura 20. Eventos moleculares en la amplificación y aceleración de la fibrinólisis.

La formación de plasmina está representada a la izquierda, el t-PA se fija a la fibrina por intermedio del módulo finger y activa el plasminógeno fijado a residuos lisina de la fibrina por medio del módulo Kringle. La plasmina hidroliza enlaces peptídicos conteniendo lisina, la lisina en posición carboxi terminal funciona como un eficaz aceptor de moléculas de plasminógeno que va a favorecer la generación de plasmina, la amplificación del proceso de activación y la lisis del coágulo <sup>(3)</sup>.

En la fase inicial, la fijación del plasminógeno se lleva a cabo por el intermediario del módulo kringle (probablemente el kringle 1) y un residuo de lisina de la fibrina incluido en la secuencia de aminoácidos de la fibrina intacta. La fijación concomitante del activador tisular, liberado por las células endoteliales cercanas a la lesión, permite la aparición de las primeras moléculas de plasmina en la superficie de la fibrina. La plasmina generada por el t-PA digiere la fibrina hidrolizando un enlace peptídico precisamente a nivel de la lisina, la cual se sitúa ahora en el extremo carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$ , o  $\gamma$  de la fibrina que ha sido digerida. La cadena lateral y el grupo carboxilo libre de las lisinas carboxi terminales constituyen un dipolo de alta afinidad para los kringle 1 y 4 del plasminógeno y para el kringle 2 del t-PA. La fijación de más moléculas de plasminógeno y de t-PA a dichos sitios incrementa la formación de plasmina y amplifica el proceso de disolución del coágulo <sup>(2)</sup>.

Así la plasmina digiere a la red de fibrina en sus más básicas unidades, el proceso de hidrólisis aparece primero como una desintegración de grandes productos que contienen tres dominios E y tres dominios entrecruzados D que son

cortados del coágulo. Este fragmento es llamado YY/DXD. Como avanza la digestión se hidroliza el fragmento DED, que contiene un dominio E y un dominio D entrecruzado. Esto deja otro gran fragmento DY/YD que consiste de dos dominios E y dos dominios entrecruzados D, y un fragmento más pequeño DED <sup>(43)</sup>, Figura 21.

La plasmina hidroliza a DY/YD en dos adicionales complejos DED que continúa hidrolizando hasta fragmentos E y fragmentos de dímeros D. Cantidades normales de estos productos de desintegración de la fibrina, fragmento E y dímeros D, son liberados a la circulación, que son removidos por el hígado y los macrófagos del páncreas<sup>(43)</sup>.



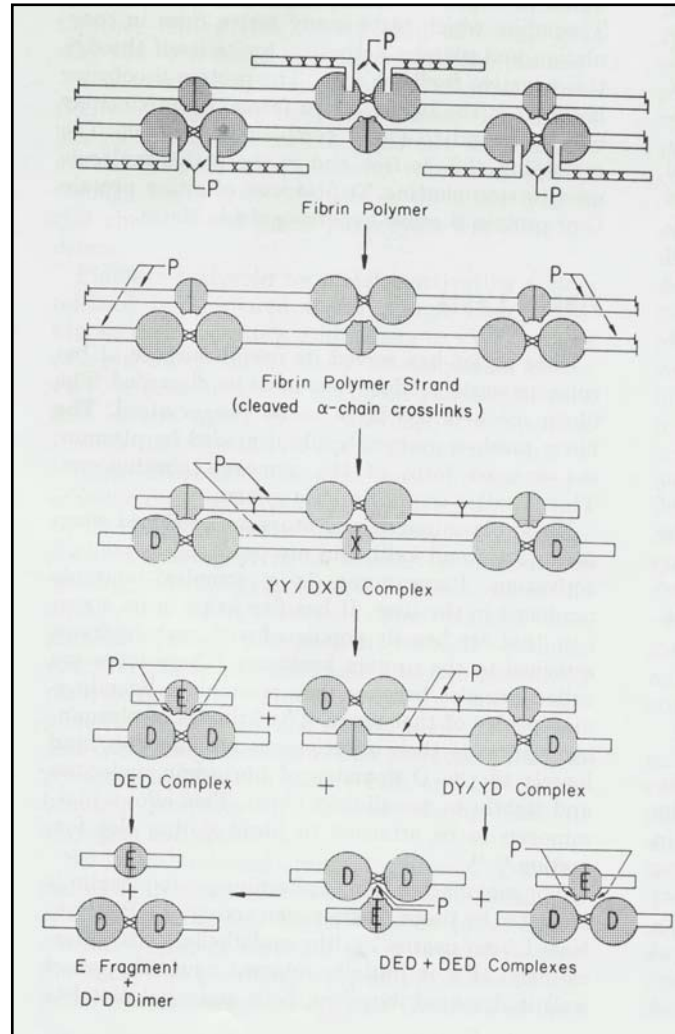


Figura 21. Digestión de la fibrina por la plasmina <sup>(43)</sup>.

### 1.8. INHIBICIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO

La inhibición el sistema de activación del plasminógeno puede ocurrir a dos niveles:

1. A nivel de la plasmina generada y
2. A nivel de los activadores del plasminógeno <sup>(3)</sup>.

### **1.8.a. Inhibición de la plasmina**

El inhibidor específico de la plasmina es la  $\alpha_2$  antiplasmina, formando un complejo estequiométrico 1:1. La velocidad de inhibición resulta de una doble interacción: una entre el extremo carboxi-terminal de la  $\alpha_2$ -antiplasmina y el LBS del kringle 1, y otra entre el sitio activo de la plasmina y el sitio reactivo del inhibidor. Es por ello que cuando el LBS de los kringles de la plasmina está fijado a los residuos lisina de la fibrina o de las proteínas de la membrana, la plasmina no puede ser inhibida. La inhibición de la plasmina liberada durante el proceso fibrinolítico hacia el plasma constituye un mecanismo de control eficaz que impide la degradación excesiva del coágulo hemostático. En caso excesivo o déficit congénito o adquirido de  $\alpha_2$ -antiplasmina,  $\alpha_2$ -macroglobulina actúa como inhibidor suplente <sup>(3)</sup>.

### **1.8.b. Inhibición de los activadores del plasminógeno**

La regulación de la actividad del t-PA es uno de los principales mecanismos de control de la fibrinólisis. La regulación a este nivel es debida no solamente a la escasa actividad enzimática del t-PA en ausencia de fibrina, sino también a la presencia en la circulación de un inhibidor específico, el PAI-1, igualmente de origen endotelial, que inhibe la acción de t-PA libre circulante. En ausencia de fibrina, el t-PA liberado por la célula endotelial forma en algunos segundos con su inhibidor específico un complejo t-PA•PAI-1 aparentemente inactivo, cuya naturaleza y función en la circulación no están aún completamente definidas. Esto implica que al formarse

la fibrina en el espacio intravascular, un fenómeno de competencia se instala entre la fibrina y el PAI-1 por la fijación del t-PA<sup>(2)</sup>, figura 22.

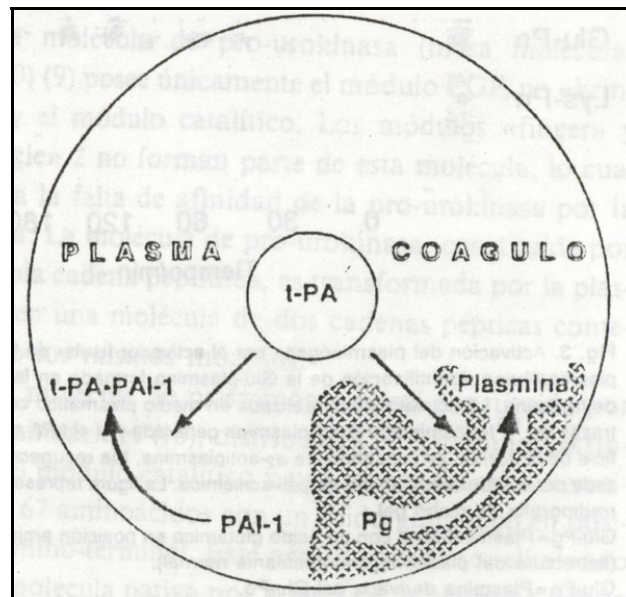


Figura 22. Regulación de la actividad del t-PA<sup>(2)</sup>.

La formación del complejo inactivo t-PA•PAI-1 o del complejo fibrinolítico t-PA•fibrina, dependerá de la concentración de PAI-1 en el plasma y de la cantidad de la fibrina formada, ya que las constantes de afinidad entre estas proteínas son similares ( t-PA/PAI-1 = 1.2 nM; t-PA/fibrina = 1.4 nM ). El exceso de este inhibidor en la circulación ha sido asociado a múltiples estados trombóticos incluyendo a infartos al miocardio. La función de PAI-1 está estrechamente asociada a la presencia de vitronectina con la cual forma un complejo circulante que estabiliza su actividad inhibidora<sup>(2)</sup>.

PAI-1 almacenado en las plaquetas puede ser liberado localmente en el sitio de la formación del tapón hemostático y puede inhibir la acción de t-PA, por lo tanto previene la lisis prematura del coágulo <sup>(8)</sup>.

El sistema fibrinolítico es también modulado por la proteína C. La proteína C activada estimula la actividad fibrinolítica al disminuir la actividad de PAI-1 <sup>(8)</sup>.

### **1.9. PROTEOLÍISIS EXTRACELULAR**

La proteólisis extracelular es uno de los múltiples caminos por los cuales una célula puede modificar su medio ambiente. Los sistemas enzimáticos capaces de digerir los componentes de las matrices extracelulares, de activar precursores o formas latentes de factores de crecimiento son una parte crítica de la biología de las células dentro de los tejidos. La identificación y caracterización de tales sistemas enzimáticos han revelado la variedad de fenómenos biológicos implicados en la proteólisis extracelular. Los estados tempranos de la embriogénesis, como son las reacciones de fertilización y post fertilización, la implantación del embrión, la formación de vasos sanguíneos y la migración celular durante organogénesis aún en el adulto, uno o múltiples estados de su ciclo celular, de todas las células del organismo se confían en la proteólisis extracelular para catalizar modificaciones de sus alrededores <sup>(6)</sup>.

Para la plasticidad, estructura y función del tejido se requiere de la proteólisis extracelular, es importante para mantener la fluidez del medio extracelular, en los

espacios intercelulares como en el compartimiento vascular, estructuras ductales y en las cavidades del cuerpo <sup>(6)</sup>.

Una proteólisis extracelular inadecuada, insuficiente o excesiva, es perjudicial para la arquitectura y función del tejido. En vista de todo esto, se observan una multiplicidad de mecanismos envueltos en el control, sincronización, intensidad y localización de procesos bioquímicos irreversibles. La falta de regulación son eventos primarios o accesorios en la patogénesis de muchas enfermedades y la búsqueda dirigida en comprender mejor estos procesos han proveído nuevas y mejores terapéuticas en la patogénesis de muchas enfermedades. El progreso en la terapia trombolítica es uno de los desarrollos que han llevado a comprender con más detalle las proteasas extracelulares y sus mecanismos celulares y moleculares responsables en el control de su actividad <sup>(6)</sup>.

### **1.9.a. Interacción de los componentes del sistema fibrinolítico durante la proteólisis extravascular**

La migración de células, invasión y remodelación de tejidos envuelven desintegración controlada de la matriz extracelular. Por lo tanto, el sistema fibrinolítico juega un importante papel en el proceso así como en la invasión del tumor y metástasis, desarrollo e involución de órganos, procesos inflamatorios y reparación de tejidos <sup>(4, 31, 32)</sup>. A pesar de que estos procesos son algo diferentes, existe un mecanismo común para desintegrar la matriz celular. Se ha demostrado que la prouroquinasa es el más importante inductor de la proteólisis extracelular en el espacio extravascular. Receptores celulares que focalizan este activador en la

membrana celular y potencializan la activación del plasminógeno se han identificado en células del sistema monocito/macrófago, células endoteliales y otros tipos celulares entre ellos células tumorales <sup>(6, 33, 53)</sup>.

Pro-u-PA, liberada por dichas células, se une a su receptor, una proteína rica en hidratos de carbono, anclada en la membrana celular por un glicerofosfolípido, cuya movilidad membranal facilita la acumulación de la pro-uroquinasa en áreas en donde se requiere su actividad proteolítica. La pro-u-PA se une al receptor a través de una secuencia localizada en el módulo EGF descrito anteriormente.

Las células que sintetizan estos receptores poseen igualmente la capacidad de fijar el plasminógeno por una interacción entre los LBS de los kringles y proteínas de la membrana que presentan los residuos de lisina en posición carboxi terminal. El plasminógeno también se puede fijar a proteínas de la matriz extracelular <sup>(41)</sup>.

La localización de los activadores y del plasminógeno en la membrana celular o en la matriz extracelular conduce a la formación de plasmina cuya actividad se ve aumentada 50 veces más que en su forma libre, con características similares al proceso que ocurre en la superficie de la fibrina: la activación del plasminógeno es inducida, potenciada y controlada localmente, de igual manera que metalo-proteinasas como colagenasas y estromelina; se activan también los factores de crecimiento y junto con la digestión del tejido hay proliferación celular. La célula es así transformada en una poderosa fuente de proteólisis pericelular <sup>(41, 56, 62)</sup>. En células adherentes, los receptores de u-PA, se encuentran especialmente en los sitios de adhesión local y son co-localizados con vinculina. En las células migratorias, por otro lado, u-PA receptor se encuentra en la orilla donde se invade

<sup>(33)</sup>. Ambos activadores e inhibidores de los activadores del plasminógeno, y predominantemente PAI-2 intracelulares, son capaces de inhibir la unión al receptor de u-PA. Los complejos formados son entonces internalizados por vía receptor LRP. En adición a la digestión de la matriz, la actividad proteolítica también genera actividad de los factores de crecimiento en el hepatocito, transforma los factores de crecimiento o factores estimulantes de colonias y por lo tanto regula la expresión de los componentes del sistema fibrinolítico al igual que la proliferación celular <sup>(33)</sup>. Además, el hecho de que u-PA receptor es una proteína de anclaje, GPI, es capaz de inducir fosforilación de tirosin cinasas y contribuir a la modulación de actividades celulares del sistema fibrinolítico <sup>(4, 74, 83, 84)</sup>.

## CAPITULO 2

### CONSIDERACIONES PATOLÓGICAS DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Se ha descrito la secuencia de interacciones proteína-proteína y de procesos enzimáticos que culminan en la generación de la plasmina y en la disolución específica del coágulo y que evitan la existencia en el plasma de fibrinogénesis y de proteólisis generalizadas. En condiciones fisiológicas el sistema fibrinolítico contribuye eficazmente a la lisis de microtrombos y a la reparación de lesiones vasculares <sup>(2)</sup>.

Los defectos o alteraciones en el sistema fibrinolítico rompen el balance entre la actividad procoagulante y anticoagulante de la sangre y se produce trombosis al disminuir la actividad fibrinolítica y tendencia al sangrado al incrementarse dicha actividad <sup>(43)</sup>.

Por lo que los trastornos de la fibrinólisis son alteraciones en la regulación de su actividad, al aumentar la cantidad de activadores del plasminógeno que lo convierten a plasmina dentro de la circulación o al disminuir sus inhibidores que no pueden limitar su actividad <sup>(40, 47)</sup>,

Los mecanismos potenciales para reducir la actividad fibrinolítica se muestran en la figura 23.



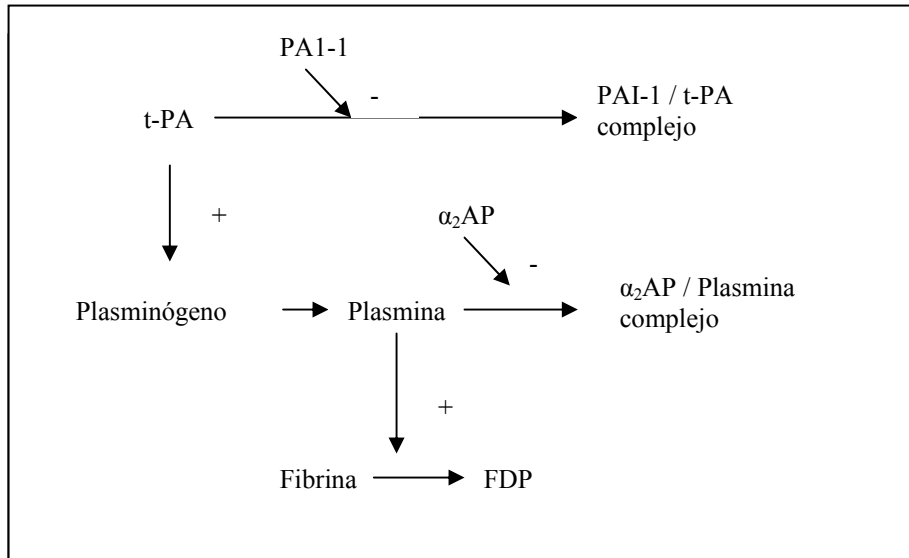


Figura 23. Regulación de la Fibrinólisis <sup>(39)</sup> .

En ciertas situaciones patológicas, el consumo excesivo (CID) o la producción deficiente (insuficiencia hepática) de alfa 2 antiplasmina pueden conducir a un exceso de plasmina circulante originando un estado fibrinolítico y proteolítico sistémico. Una situación similar, pero debida a un exceso de activador, puede observarse como consecuencia de los tratamientos trombolíticos <sup>(2, 40)</sup>.

Las dos más importantes condiciones que predisponen a un paciente a sangrar son la fibrinólisis primaria y la coagulación intravascular diseminada (CID)

Las cuatro mayores condiciones que predisponen a un paciente a tener trombosis son deficiencia de plasminógeno, defecto de  $\alpha_2$  antiplasmina, defectos de los activadores y deficiencia del activador del plasminógeno. Los estados coagulantes

adquiridos pueden dirigir a trombosis (condiciones de hipercoagulabilidad), por lo que la reducida actividad fibrinolítica favorece la trombosis <sup>(43)</sup>.

El sistema fibrinolítico del plasma puede ser dañado por deficiencias hereditarias del plasminógeno, defectos en la liberación del activador del plasminógeno del endotelio vascular, y por altas concentraciones plasmáticas de las proteínas reguladoras tales como inhibidores de los activadores, un ejemplo es la  $\alpha_2$  macroglobulina, ATIII,  $\alpha_1$  antitripsina y C1.

## **2.1. PATOLOGÍA DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO**

### **2.1.a. Fibrinólisis Primaria**

La fibrinólisis primaria se refiere a fibrinogenólisis o una inapropiada fibrinólisis que aumenta de novo en ausencia de un evento trombótico primario <sup>(40, 43, 47)</sup>, como se menciona anteriormente, es una liberación masiva de activadores en la circulación.

La fibrinólisis primaria esta muy poco documentada y en muchos casos puede representar una respuesta inapropiada a CID <sup>(43)</sup>. El incremento de la actividad fibrinolítica se observa en muchas condiciones sistémicas como shock, hipoxia, hipotensión, estados de ansiedad, golpe de calor , hemorragia aguda, cirrosis hepática, intoxicaciones, cirugía torácica, complicaciones en terapia trombolítica o en cirugías mal controladas, entre otros <sup>(43)</sup>.

La primera manifestación de fibrinólisis primaria es la hemorragia, normalmente no hay alteraciones en la coagulación. Generalmente la hemorragia por fibrinólisis primaria es muy grave <sup>(47, 48)</sup>.

El incremento de la actividad fibrinolítica se ha visto en personas normales sin razón aparente. En personas sin trastornos sistémicos de hemostasis, la hemorragia puede resultar de una hiperfibrinólisis localizada. Los órganos con altos niveles de actividad fibrinolítica como el útero, pelvis renal son más afectados, la menorragia esencial, hemorragias subaracnoideas y hemorragia gastro intestinal son ejemplos de excesiva fibrinólisis localizada.

Existen numerosos comunicados que describen hemorragia asociada al aumento de fibrinólisis en una gran variedad de procesos neoplásicos como leucemias, carcinomas entre otros <sup>(37, 47, 49, 50)</sup>.

El diagnóstico de laboratorio de fibrinólisis primaria se obtiene por tiempos de sangrado en sangre total y tiempo de lisis de euglobulinas recortados; placas de fibrina positivos y complejos plasmina-antiplasmina circulantes positivos <sup>(37, 40, 47)</sup>.

### **2.1.b. Fibrinólisis Secundaria**

La fibrinólisis que sigue a un depósito de fibrina corresponde a la fibrinólisis secundaria, porque el depósito de la fibrina es el primer evento. Cuando un evento de coagulación intravascular diseminada ocurre se deposita una gran cantidad de fibrina en la microcirculación, la fibrinólisis secundaria puede causar una acumulación de grandes cantidades de PDF en la sangre, el ejemplo más común es la CID <sup>(43)</sup>.

La fibrinólisis secundaria a CID remueve el depósito de fibrina en la microcirculación protegiendo al organismo y liberándolo del daño <sup>(41)</sup>, pero este efecto protector que activa la fibrinólisis va acompañado de un incremento en la coagulación intravascular con tendencia a hemorragia; al mismo tiempo se liberan grandes cantidades de t-PA que activa la plasmina, la cual digiere más fibrina y si no es suficientemente inactivada por sus inhibidores ( $\alpha_2$ antiplasmina y  $\alpha_2$ macroglobulina) se encuentra libre en la circulación y digiere las proteínas plasmáticas (factores Va y VIIIa) y el fibrinógeno.

Las pruebas de diagnóstico para establecer la evidencia de la actividad fibrinolítica en resumen son el aumento de la plasmina y la disminución del plasminógeno que nos dan evidencia directa de la actividad del sistema fibrinolítico, la disminución de la  $\alpha_2$ -antiplasmina y el complejo plasmina-antiplasmina, plasmina- $\alpha_2$  macroglobulina, pueden determinarse por métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

### **2.1.c. Coagulación Intravascular Diseminada (CID)**

Se ha definido como un padecimiento secundario, agudo o crónico, en el que se caracteriza por la activación anormal de la coagulación principalmente intravascular, que altera su hemostasis, hay producción y consumo exagerados de los factores de la coagulación; originando aumento en la formación y destrucción de la fibrina según la localización, intensidad y duración; complicaciones como hemorragia, trombosis, choque y muerte <sup>(41)</sup>.

Más recientemente Colman la define como un proceso patológico de etiología múltiple debido a la presencia de trombina en el torrente circulatorio lo cual va a ocasionar las diversas patologías de este síndrome:

- Aumento en la producción de fibrina.
- Activación de los factores V y VIII, que activan al factor Xa el cual induce más producción de trombina.
- Activación de la proteína C que inactiva a los factores Va y VIIIa.
- Agregación de plaquetas, que desarrolla trombocitopenia.
- Estimulación del endotelio para secretar activador tisular del plasminógeno lo que produce fibrinólisis <sup>(41)</sup>.

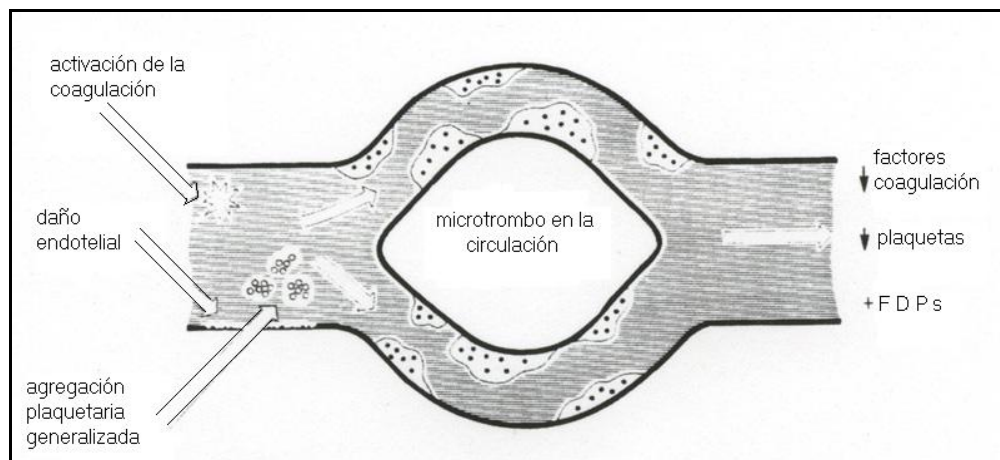


Figura 24. Patogénesis de CID  
Cambio en los factores de la coagulación,  
plaquetas y productos de digestión  
de la fibrina que ocurre en el síndrome <sup>(45)</sup>.

Con el aumento de trombina se genera la aparición de todas las características clínicas y de laboratorio propias de este síndrome, hipofibrinogenemia, trombocitopenia, fibrinólisis, hemorragia y microtrombosis <sup>(41)</sup>.

Las causas de CID pueden ser daño endotelial (figura 24) y daño tisular. Entre las causas de daño tisular extenso como craneoencefálico y politrauma, tumores malignos y patologías del embarazo. Las causas de daño endotelial es la sepsis de cualquier origen, organismos gram positivos y gram negativos, y las causas no sépticas como hemangiomas gigantes congénitos y aneurismas aórticos adquiridos <sup>(41)</sup>.

El depósito generalizado de trombos de fibrina en la microcirculación produce isquemia y consumo exagerado de factores importantes como son el FV y FVIII, fibrinógeno, protrombina y plaquetas produciéndose manifestaciones hemorrágicas características del síndrome. Como un mecanismo compensatorio, el endotelio vascular secreta t-PA e induce así fibrinólisis secundaria que tiene por objeto desaparecer el exceso de fibrina formada y evitar la oclusión de los vasos de la microcirculación en este proceso generador se producen los productos de desintegración de la fibrina-fibrinógeno (PDF/f), los que a su vez al interferir con la agregación plaquetaria, polimerización de la fibrina y actividad de la trombina incrementan la hemorragia <sup>(41)</sup>.

El estado agudo de CID es menos común que su estado crónico. El estado agudo puede ser asociado a muchas enfermedades del colágeno, autoinmunes y cáncer<sup>(35, 37)</sup>.

En el síndrome crónico los niveles de los factores de la coagulación pueden estar normales o elevados y puede no haber hemorragia o trombosis, pero en su cuadro agudo el sangrado puede ser muy grave en donde las plaquetas y los factores V, VIII, II y I pueden estar disminuidos. El síndrome crónico es difícil de diagnosticar pues las plaquetas y los factores de la coagulación pueden no ser bajos y la presencia de trombina circulando puede ser una evidencia directa de coagulación intravascular; pero la trombina puede combinarse con antitrombina y no ser identificada directamente. Por todo esto es necesario identificar productos de la actividad de la trombina, como son los monómeros de fibrina. Los monómeros de fibrina y los productos de digestión de la fibrina/fibrinógeno forman complejos de fibrina soluble que pueden ser detectados por aglutinación de eritrocitos, y ha sido desarrollado un anticuerpo monoclonal para detectar los dímeros D de la fibrina, digestión de la fibrina entrecruzada por el factor estabilizador <sup>(37, 50)</sup>.

Las pruebas globales de laboratorio que ayudarían a diagnosticar CID serían como pruebas primarias los tiempos de coagulación TP, TTPA, TT, los cuales se encuentran prolongados en el 50 al 70 % por la hipofibrinogenemia y deficiencia de algunos factores plasmáticos, además los PDF y la trombina circulantes interfieren en la polimerización de los monómeros de fibrina y por último debido a la fibrinólisis secundaria que generalmente acompaña CID, existe degradación de los factores V, VIII, IX y X contribuyendo de esta manera a la prolongación de los tiempos de coagulación <sup>(41)</sup>.

La determinación de estos tiempos son pruebas prácticas y fáciles pero por si solas no ofrecen gran utilidad, ya que pueden ser modificadas por múltiples causas e

inclusive por la misma patología de base. Son útiles cuando se realizan con correcciones con plasma y diluciones con solución salina para diferenciar si existe deficiencia de factores o presencia de inhibidor circulante, cuando hay deficiencia de factores el plasma corrige al agregarle plasma normal y se prolonga aún más al agregarle solución salina; mientras que cuando existe inhibidor corrige al diluir el plasma con la solución salina pues se diluye también el inhibidor <sup>(41)</sup>.

#### **2.1.d. Hipercoagulabilidad**

Los trastornos fibrinolíticos y las deficiencias de los inhibidores naturales pueden conducir a un estado hipercoagulable o pretrombótico. Es un estado en el que ha sido perturbado parcialmente el sistema a la formación de un depósito de fibrina. El estado hipercoagulable secundario es la activación subclínica de la coagulación por alguna causa y el estado primario menos común en el que hay una deficiencia de un inhibidor y se refiere a deficiencias congénitas. Las condiciones más comunes del estado secundario son estasis de flujo sanguíneo, estados postoperatorios, embarazo, uso de anticonceptivos orales y malignidad <sup>(43, 50, 51)</sup>.

La estasis del flujo sanguíneo permite la acumulación de sustancias procoagulantes tales como los factores de coagulación activados y facilita la interacción de las plaquetas con el vaso sanguíneo. El incremento de los niveles de factores de la coagulación y fibrinógeno durante los procesos inflamatorios se explica porque son proteínas reactantes de fase aguda, aunque también puede ser una respuesta a dicho proceso que va acompañado de trombosis <sup>(43)</sup>.



No hay una prueba específica que nos revele el estado pretrombótico; se recomienda la determinación de TTPA, ATIII, conteo de plaquetas, actividad fibrinolítica. El conteo de plaquetas puede estar incrementado, su adhesividad y agregabilidad también aumentadas pueden contribuir al potencial trombótico, aun cuando el número de plaquetas sea normal. Valores de TTPA menor de 28 segundos en pacientes postoperativos es un fuerte indicador de riesgo de trombosis <sup>(43)</sup>.

## CAPÍTULO 3

### ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN EL CÁNCER

Las alteraciones de la hemostasia son frecuentemente encontradas en padecimientos neoplásicos, la prevalencia varía de acuerdo con el tipo de tumor, su extensión y su grado de diferenciación, las anormalidades están presentes en un 50 % de todos los pacientes, aumentando hasta 90% en enfermedad metastásica <sup>(42)</sup>.

La hemostasia se encuentra alterada en los componentes del sistema de la coagulación y el sistema de la fibrinólisis tanto cualitativa, como cuantitativamente así como defectos por cambios adquiridos por la diferenciación celular y por el tratamiento de la enfermedad <sup>(41, 42)</sup>.

Sobre un 15% de los pacientes experimentan eventos trombóticos y hemorrágicos como complicaciones primarias <sup>(41, 42)</sup>.

La conexión entre crecimiento de las células malignas y el sistema de coagulación y fibrinólisis ha sido reconocido desde hace muchas décadas. En años recientes esta área ha recibido nueva atención y datos experimentales sugieren un papel importante de ambos sistemas en el desarrollo, progresión y metástasis del tumor. También algunos datos clínicos sugieren que pueden influir el curso de la enfermedad maligna <sup>(55)</sup>.

La asociación de trombosis y cáncer ha sido reconocida desde hace más de 100 años, era asociada aunque su conocimiento no era completo; Trosseau en 1865 comunicó un aumento en la incidencia de trombosis venosa en pacientes con neoplasias malignas. Posteriormente otras manifestaciones trombóticas tanto arteriales como venosas se han descrito asociadas a cáncer y se han incluido en el

síndrome de Trosseau. También la trombosis venosa puede aparecer como la primera manifestación del proceso neoplásico, y se ha descrito hasta el 34 % de pacientes con diagnóstico inicial de trombosis venosa idiopática que desarrollan algún tipo de cáncer entre 4 y 68 meses antes de establecido el diagnóstico de cáncer <sup>(38, 41)</sup>.

La incidencia de trombosis en pacientes con cáncer varía entre el 5% al 15% en general; sin embargo, pueden alcanzar hasta el 50% en ciertos carcinomas como es el de páncreas, estómago, ovario, pulmón y vesícula biliar. Así también se ha reportado un aumento de complicaciones trombóticas en pacientes sometidos a tratamiento con quimioterapia e intervenciones quirúrgicas. <sup>(41, 46, 51)</sup>.

En los avances actuales en la fisiología del estado pretrombótico se ha encontrado que hay mecanismos normales contra dicho estado. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes naturales. La hemostasia es una función que requiere de una regulación antitrombótica para impedir que un coágulo se extienda más allá de las necesidades fisiológicas, debe ser autolimitada, localizada y transitoria <sup>(41)</sup>.

Los mecanismos fisiológicos antitrombóticos incluyen antitrombina III, que inhibe los factores activados IIa, Xa, IXa y XIIa. Las proteínas C y su cofactor la proteína S, que al unirse a trombomodulina inhibe a los cofactores Xa y II, los factores Va y VIIIa. Estos dos sistemas limitan la generación de trombina y de fibrina. Otros mecanismos son el de la prostaciclina del endotelio normal que limita el depósito de plaquetas al coágulo en formación y el sistema fibrinolítico, que tiene por objeto disolver el coágulo formado a través de la digestión enzimática de la fibrina.

Además, el flujo normal de la sangre tiende a remover y diluir factores de la coagulación que son inapropiadamente activados. El tratamiento del cáncer puede causar coagulación y la fisiología del sistema de la coagulación puede estar relacionado con la diseminación de un neoplasma particular <sup>(49)</sup>.

Entender la coagulación en un paciente con cáncer es importante porque el estado maligno predispone a un estado hipercoagulable, el tratamiento del cáncer puede causar coagulación y la fisiología del sistema de la coagulación se puede relacionar a la diseminación de un neoplasma en particular <sup>(38)</sup>.

En el estado hipercoagulable se ve alterado el flujo sanguíneo, la pared del vaso y el endotelio así como la composición de la sangre <sup>(39, 41)</sup>.

El flujo sanguíneo puede ser interrumpido por compresión de un tumor o invasión del mismo así como cateterismos que hacen cambiar su composición y activan la coagulación sanguínea, al verse alterado el flujo sanguíneo existe un retraso en la dilución y depuración de los factores activados de la coagulación, así también como un daño de las válvulas debido a hipoxia; el prolongado descanso en cama aumenta la estasis venosa y debilita al paciente, la hipoxia puede estar más agravada por la anemia grave y por las recientes cirugías a las que son sometidos estos pacientes <sup>(39, 41)</sup>.

La pared de los vasos sanguíneos puede estar invadida o comprimida por el tumor; los tumores también pueden infiltrar las paredes de los vasos por extensión directa de sus sitios extrínsecos. La reducción del contenido del t-PA en el endotelio y la activación de la fase de contacto de la coagulación debido a un incremento en el tono vascular puede ser un posible mecanismo de este problema, el sistema de

coagulación también puede ser activado por las células tumorales lo cual lleva a un estado de coagulación intravascular diseminada, todas estas anomalías pueden estar implicadas en la patogénesis de la trombosis en pacientes con cáncer (34).

Generalmente se han propuesto tres mecanismos de activación de la trombosis en el cáncer

- La activación plaquetaria por las células del tumor
- Producción de un estado procoagulante por macrófagos y monocitos activados
- Producción directa de procoagulantes por las células tumorales.

### **3.1. COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA DEBIDA A MALIGNIDAD**

La coagulación intravascular diseminada es frecuentemente encontrada en los procesos malignos, las sustancias producidas por las células tumorales activan la cascada de la coagulación al ser liberadas en el torrente sanguíneo, hay formación de trombina, se produce un trombo de fibrina en la microcirculación y el sistema fibrinolítico es activado lo cual causa una mayor depleción de fibrinógeno y otros factores de la coagulación. Esta fibrinólisis secundaria causa una elevación de la concentración de productos de desintegración de la fibrina/fibrinógeno los cuales interfiere con la agregación plaquetaria y la polimerización del coágulo de fibrina que contribuyen a las manifestaciones de hemorragia (35, 37, 41, 43).

La forma aguda ocurre en pacientes con tumores de rápida replicación y necrosis del mismo tumor. El síndrome crónico es visto en pacientes con tumores de bajo crecimiento donde existe poca lisis donde el proceso de activación de la coagulación

puede padecerse de semanas o meses y en muchas ocasiones son compensadas <sup>(37, 43)</sup>.

Las terapias citotóxicas también contribuyen a estos estados, los mecanismos de quimioterapia inducen trombosis al disminuir la proteína C, incrementar la producción de fibrinopéptido A e incrementan la reactividad de las células endoteliales como mecanismos principales. La liberación de factor tisular de los monocitos y células endoteliales, la baja regulación de la trombomodulina y la disminución de respuesta fibrinolítica también predisponen a trombosis <sup>(34, 39, 50, 51)</sup>.

La presencia de la fibrina alrededor de los cortes histológicos del tumor muestra evidencia de activación de la coagulación en el área. Otro mecanismo de activación independiente de la trombina es a través del ácido siálico de la célula del tumor y algunos otros componentes de la superficie celular como son fosfolípidos, Ca ++ y proteína de alto peso molecular <sup>(38)</sup>.

### **3.2. FIBRINOLISIS PRIMARIA Y CÁNCER**

El papel de la fibrinólisis es más importante en la diseminación del tumor y metástasis. La alta actividad fibrinolítica del tumor primario facilita la invasión local y la liberación de células neoplásicas dentro del torrente circulatorio o linfático <sup>(42)</sup>.

En la asociación entre el sistema fibrinolítico y el cáncer; muchas proteínas fibrinolíticas al ser expresadas en exceso por las células tumorales y las células normales que rodean al tumor colaboran al crecimiento y diseminación del mismo <sup>(38, 54, 55, 71, 79, 80)</sup>. Estas condiciones patológicas generan una remodelación del tejido e inflamación y están asociadas con la formación de nuevos microvasos sanguíneos

(angiogénesis) que nutren al tumor <sup>(103)</sup>, la digestión proteolítica de la matriz extracelular que rodea al tumor elevan la supervivencia del mismo, su progresión y metástasis, aumentando las características de la enfermedad maligna <sup>(57, 61, 71, 78, 79, 80, 97)</sup>.

Las proteasas del sistema del fibrinolítico y la familia de las metaloproteinasas, así como otros sistemas involucrados, juegan un importante papel en estos procesos <sup>(56, 57, 65)</sup>. Además de los efectos proangiogénicos, las proteasas también pueden regular negativamente la angiogénesis; los fragmentos de proteínas que resultan de la digestión de la matriz extracelular y otras proteínas pueden tener propiedades antiangiogénicas <sup>(78, 79, 103)</sup>, actuando como inhibidores, esta modulación de la angiogénesis, por estimulación o inhibición de varios componentes moleculares, regula dicho proceso <sup>(79, 80)</sup>.

Así la fibrinólisis es un vital componente en la patogénesis de la enfermedad neoplásica, es esencial para liberar células tumorales de su sitio de origen, proveyendo nutrición para el crecimiento de las células neoplásicas y promoviendo su movilidad y motilidad celular <sup>(71, 72, 79)</sup>.

En la fibrinólisis primaria hay evidencia de la activación sistémica de la plasmina o directa digestión del fibrinógeno. Esto puede ocurrir por una variedad de mecanismos incluyendo producción directa del tejido del tumor que libera activadores del plasminógeno tanto tisular (t-PA) o tipo uroquinasa (u-PA) y por digestión directa del fibrinógeno por la plasmina <sup>(37)</sup>, así como citosinas que inducen a las células adyacentes al tumor a producir factores fibrinolíticos, <sup>(79)</sup>.

La sobre expresión de los activadores del plasminógeno ha sido muy estudiada en diferentes tejidos tumorales, existen reportes de estudios en cáncer de colon, próstata, mama, pulmón, glioblastoma, encontrando que estas células secretan u-PA y su receptor celular u-PAR que media la invasión de la membrana basal y matriz extracelular <sup>(55)</sup> como barreras anatómicas que controlan la dispersión celular, ver figura 26 <sup>(59, 60, 62, 106)</sup>.

La sobre-expresión de estos componentes fibrinolíticos promueve el crecimiento, invasión y dispersión metastásica de las células tumorales por múltiples mecanismos, así las células adquieren ventajas de supervivencia y crecimiento <sup>(60, 61)</sup>.

Adicionalmente al receptor de uPA, las células tumorales expresan un receptor a plasminógeno (plasmina) <sup>(106)</sup>.

Este sistema de receptores asociados a la membrana mantienen activas u-PA y plasmina proveyendo un sistema activo de proteasas en el sitio de digestión y remodelación del tejido. La efectiva invasión de las células del tumor, la proteólisis localizada y la metástasis con un crecimiento secundario del tumor entre otros factores forman parte de un crítico balance de la proteasa u-PA, su receptor u-PAR y sus inhibidores PAI-1/2 (ver figura 25) <sup>(59, 106)</sup>. Como se ha demostrado en modelos experimentales la sobre expresión de u-PAR incrementa la invasión y metástasis del tumor <sup>(10, 73)</sup>. u-PAR además de centrar la actividad catalítica, participa en la señalización celular, interacciones con otros receptores de membrana (integrinas), motilidad celular, adhesión e invasión así como angiogénesis, la sobre expresión de



u-PA, u-PAR es una característica de la malignidad y esta asociado a progresión del tumor y metástasis <sup>(59, 62, 78)</sup>.

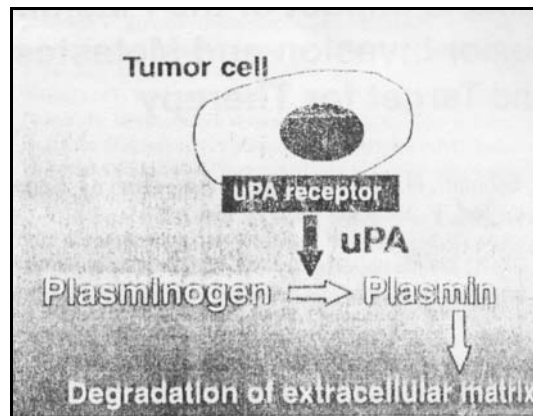


Figura 25.- Focalización de la actividad proteolítica en la superficie de la célula tumoral <sup>(106)</sup>.

Las reacciones catalizadas por u-PA en la activación del plasminógeno se ilustra en la figura 26, u-PAR y u-PA son consistentemente expresados en el foco invasivo en muchos tipos de cánceres humanos como se ha mencionado <sup>(10, 60, 106)</sup>. Algunas de estas moléculas son expresadas por células estromales no malignas tales como macrófagos y trofoblastos, indicando que estas células contribuyen activamente en el proceso de invasión <sup>(10)</sup>.

Otros estudios realizados han demostrado que existe un crítico balance entre la producción de u-PA y PAI-1 para que la célula sea óptimamente invasiva además de los otros sistemas que son activados por ellos <sup>(55)</sup>.

La relación con otros sistemas, otros factores como los factores de crecimiento, otros receptores como las integrinas y la endocitosis de los receptores

permite una reorganización espacial de los sistemas celulares y una selectiva digestión de los tejidos que rodean al tumor <sup>(64)</sup>.

En particular las proteasas del sistema fibrinolítico actualmente tienen un valor pronóstico en este estado clínico <sup>(18)</sup>, altos niveles de u-PA, PAI-1 y uPAR en múltiples tipos de cáncer correlaciona con adverso pronóstico para el paciente <sup>(72)</sup>.

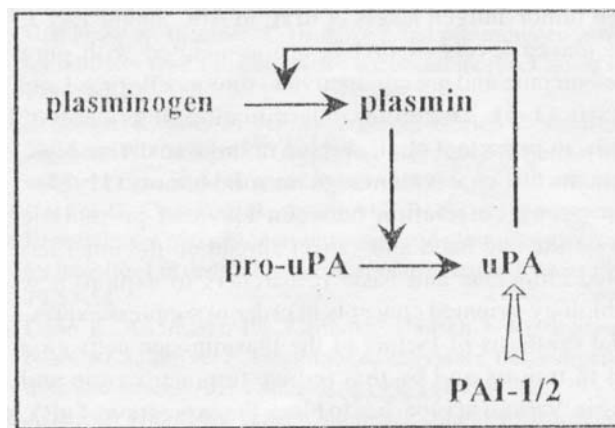


Figura 26. La activación del plasminógeno por u-PA <sup>(106)</sup>.

### 3.3. PROCESO METASTASICO Y ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIS

Datos experimentales sugieren un importante papel para los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis en el desarrollo, progresión y metástasis del tumor, así como su influencia en beneficiar el curso de la enfermedad maligna <sup>(54, 55, 80)</sup>.

La activación del sistema hemostático en la progresión del tumor no es aislado, también intervienen otros sistemas biológicos como el sistema del complemento, sistema Kinina, proteínas como glucoproteínas adhesivas de la superficie celular, factores de crecimiento, prostaglandinas entre muchos otros <sup>(54, 56)</sup>.

El proceso metastático se caracteriza inicialmente por invasión local, donde el cáncer migra a través de la membrana basal hacia dentro del área estromal; esta transición es dependiente de la proteólisis local y la movilidad de las células tumorales, se desarrolla en varios pasos:

- 1) adhesión e interacción de las células tumorales con los componentes de la membrana basal y la matriz extracelular.
- 2) Proteólisis local.
- 3) Migración de las células del tumor.

La regulación de la proteólisis extracelular en cáncer involucra una compleja relación entre las células del cáncer y las células estromales normales en la expresión de los componentes moleculares que intervienen en este proceso <sup>(58)</sup>.

Todo esto nos lleva a proponer que el desarrollo del cáncer es esencialmente un proceso de remodelación tisular <sup>(57, 64, 74)</sup>, donde el tejido normal es substituido por el tejido canceroso. Un crucial papel en éste proceso se le atribuye a la degradación proteolítica de la matriz extracelular. Esta degradación es iniciada por proteasas que son secretadas por diferentes tipos de células, incluso células tumorales que activan la expresión o actividad de otras proteasas <sup>(54, 57, 79)</sup>.

Este proceso de degradación se lleva a cabo en una armoniosa acción de una compleja cascada de varios sistemas de enzimas proteolíticas,

- 1) Metaloproteasas de la matriz extracelular que incluyen colagenasas, gelatinasas y estromelisinias
- 2) Cisteín proteasas que incluyen catepsinas B/L,
- 3) aspartil proteasas: catepsina D

4) Serín proteasas: plasmina y activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) <sup>(57, 66)</sup>.

Las enzimas proteolíticas pueden actuar directamente a digerir la ECM o indirectamente al activar otras proteasas. las cuales entonces actúan en determinado orden de su activación. Cuando la proteasa ejerce su acción a otra proteasa, al final el resultado es una cascada que dirige a la proteólisis.

Presumiblemente el orden de eventos en esta complicada cascada de proteólisis inicia con la aspartil proteasa (catepsina D) que activa la cisteín proteasa (Catepsina B) que a su vez activa a la serina proteasa uPA. De esta manera uPA activa puede convertir el plasminógeno en plasmina. La Catepsina B como la plasmina es capaz de degradar varios componentes del estroma del tumor y puede activar zimógenos de la matriz de metaloproteinasas la principal familia de proteasas que degrada la ECM. La actividad de estas proteasas es controlada por un complejo arreglo de receptores celulares e inhibidores que mantiene un balance en la acción proteolítica y antiproteolítica en el desarrollo del cáncer <sup>(57, 58, 60, 66)</sup>.

La migración y la invasión de las células tumorales depende de la capacidad invasiva de las células que van a dirigir a la pérdida de contacto en la superficie celular entre célula-célula y célula-substrato y la asociación a los sistemas enzimáticos proteolíticos <sup>(59, 60, 65)</sup>.

Así durante la invasión del tumor y metástasis, las células tumorales atraviesan la barrera de la matriz celular y extracelular al adherirse e interactuar con los componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular <sup>(96, 106)</sup> (Figura 27).

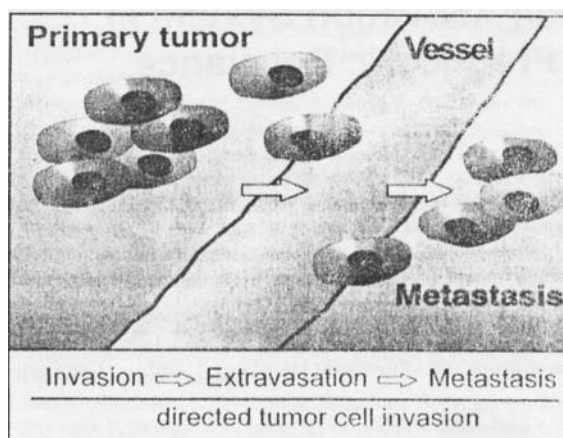


Figura 27.- Invasión y Metástasis de un tumor sólido <sup>(106)</sup>.

### 3.4. COMPONENTES DEL SISTEMA FINRINOLITICO QUE INTERVIENEN EN LA INVASION DEL TUMOR Y METÁSTASIS Y CASCADA DE EVENTOS

De los dos activadores del plasminógeno, u-PA es el que se encuentra en la desintegración de las proteínas de la matriz extracelular, activación de las metaloproteinasas y activación de los factores de crecimiento durante los procesos de remodelación tisular en condiciones normales o patológicas, incluyendo la invasión del cáncer <sup>(10, 25)</sup>. El activador del plasminógeno tipo tisular t-PA puede tener funciones significativas en ciertos tipos de cáncer como en algunos melanomas <sup>(55)</sup>.

Las células tumorales focalizan su actividad proteolítica en la superficie de la célula a través de receptores para la plasmina y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa u-PA <sup>(82, 83)</sup>, la molécula central de la proteólisis pericelular; las células la producen como una proenzima de cadena sencilla (de alto peso molecular), denominado pro-uPA, con muy poca o nula actividad enzimática, la cual puede unirse inmediatamente a su receptor específico con alta afinidad; es activado por una gran

variedad de proteasas, plasmina, catepsinas B/L, Kalicreina, termolisina y factor de crecimiento de nervio gama; en su forma activa es una enzima de doble cadena de polipéptidos unida por un puente disulfuro (enzima de bajo peso molecular) <sup>(65, 106)</sup> u-PA activa algunos mecanismos de señalización en la célula que regula los rearrreglos del citoesqueleto celular así como redistribución de contactos adhesivos, como acción no proteolítica <sup>(25, 82)</sup>.

El receptor de la célula tumoral u-PAR (CD87) (ver Figura 25), que une a u-PA liberado por el contorno de las células del tumor o de las células estromales <sup>(65, 67, 106)</sup>, localiza la proteólisis en la superficie de las células tumorales, u-PA convierte el plasminógeno en plasmina para generar la cascada proteolítica <sup>(67, 83, 106)</sup>.

Esta unidad funcional u-PA/u-PAR además de promover la proteólisis extracelular al regular la activación del plasminógeno, regula las interacciones de la célula con la matriz extracelular (ECM) como un receptor de adhesión, incrementando la afinidad del receptor para vitronectina que se encuentra abundantemente en la matriz extracelular, y los receptores de adhesión, las integrinas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , (Fig.11) que pueden funcionar como adaptadores de transmembrana <sup>(25,76,83,84,85)</sup>, estas interacciones ejercen efectos de señalización en la célula, generando una actividad quimiotáctica intrínseca, de migración y mitogénesis <sup>(59,62,68,70,73,74,75,82,83,85)</sup>.

Así como la unidad funcional u-PA/u-PAR modula la acción de las integrinas, estas afectan también las funciones de dicha unidad u-PA/u-PAR, lo cual ayuda a las células en sus actividades proteolíticas, adhesivas y migratorias <sup>(25, 73, 82, 84)</sup>.

Los efectos de señalización se sugiere son mediados por algunas familias de cinasas como Src y Janus en la migración celular <sup>(83, 84)</sup> y FAK, Hsk, MAPK <sup>(83)</sup>, en la reestructuración del citoesqueleto, que posteriormente promueven la fosforilación de activadores de transcripción como STAT1/2 induciendo a la célula a migrar <sup>(82)</sup> o como en  $\alpha_5\beta_1$  integrina coopera con EGF receptor que promueve la división celular <sup>(85)</sup>.

Estas interacciones con las estructuras del citoesqueleto de la célula como la vinculina, sugiere su papel en la movilidad celular que involucra la regulación de la actina del citoesqueleto por GTPasas de la familia de Rho, Rac y Cdc<sub>42</sub> que regulan la unión de fibras de las estructuras de la membrana celular <sup>(24, 25, 83)</sup>.

En la migración celular, Rac parece tener un papel crítico en regular la producción de protuberancias que dirige al final de la célula, Cdc<sub>42</sub> controla la dirección de la señal y Rho parece regular aspectos de la adhesión y contracción celular <sup>(24, 25, 83)</sup>. Otros trabajos realizados en fibroblastos muestran como la interacción de u-PAR con vitronectina induce protuberancias e incrementa la motilidad celular y que estos efectos son dependientes de Rac <sup>(83)</sup>.

La relevancia de las interacciones de las familias de integrinas y receptores tirosin cinasas RTKs como Ras-Raf-ERK (figura 12) y no RTKs como Cdc<sub>42</sub>-Rac-JNK como caminos de señalización acoplados a la unidad funcional u-PA/u-PAR asociado a la proliferación y migración celular ha sido demostrado en un gran número de cánceres <sup>(24, 25, 26, 86, 87, 88, 89, 90, 91)</sup>.

La acción proteolítica de u-PA es controlada por sus inhibidores PAI-1 y PAI-2, los cuales al unirse a u-PA en solución o unido al receptor celular la inactivan <sup>(106)</sup>. El

complejo inactivo u-PA:PAI-1 es rápidamente internalizado por el receptor LRP y digerido en lisosomas, la depuración de este complejo es acompañado por disminución de u-PAR en la superficie celular ya que este complejo promueve la unión de u-PAR a LRP formando el complejo u-PAR-LRP que también es endocitado por vesículas cubiertas de clatrina junto con endosomas recientes <sup>(75, 82)</sup>, los inhibidores también se unen a la superficie celular asociada al complejo u-PAR/u-PA formando un complejo trimérico enzimáticamente inactivo u-PAR/u-PA/PAI-1/2, el cual es internalizado también por la célula del tumor <sup>(10, 12, 63, 82)</sup>. Los complejos unidos al receptor entre u-PA y sus inhibidores son internalizados en un proceso en el que participa la unión del receptor de  $\alpha_2$ -macroglobulina/LRP <sup>(10, 82)</sup>.

La unión de PAI-1 a Vitronectina estabiliza a PAI-1 activo <sup>(81, 92)</sup>, localiza su sitio de acción, y ejerce efectos mas profundos al bloquear directamente la interacción de vitronectina con las integrinas de la superficie requeridas para la adhesión y motilidad celulares por la unión con u-PAR, PAI-1 compite con u-PAR por los sitios de unión a vitronectina, de tal manera que PAI-1 controla las interacciones de vitronectina a u-PAR e integrinas <sup>(80, 81, 82, 92)</sup>, por lo que PAI-1/Vn tiene una función regulatoria en la fibrinólisis, trombolisis y adhesión celular en la diseminación del cáncer <sup>(92)</sup>.

Niveles altos de PAI-1 activo controla la angiogénesis y afecta la migración, la falta de balance en estos procesos tiene particular significado en el proceso de malignidad, estudios realizados en casos de cáncer de mama <sup>(55)</sup> y otros cánceres, muestran correlación entre el incremento de PAI-1 y u-PA y la disminución de



remisión y libre supervivencia de la enfermedad, como consecuencia un pobre pronóstico esto demuestra que PAI-1 no simplemente actúa como antagonista de u-PA, <sup>(81, 82)</sup> sino que puede tener otras propiedades, desde que PAI-1 dirige a la célula a internalizar el complejo u-PA/u-PAR, puede también disminuir los niveles de u-PA y u-PAR en la superficie celular e inhibir la quimiotaxis de u-PA; sin embargo, PAI-1 también es quimiotáctico para una variedad de células y existe en la regulación de las células que migran, estas observaciones aparentemente contradictorias o conflictivas sugieren que PAI-1 puede inhibir o estimular la migración celular y puede ser relacionado a las diferencias de concentración local, a bajas concentraciones parece promover la angiogénesis mientras que a altos niveles la inhibe. Cualquiera que sea el caso, su propiedad de inducir a la internalización del complejo u-PA/u-PAR/integrinas dependiente de LRP sugiere que LRP puede regular la migración celular dependiente de u-PAR con cambios correspondientes en la morfología de la célula, reorganización del citoesqueleto y redistribución de fosforilación de tirosinas <sup>(74)</sup>.

El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (PAI-2) es un eficiente y específico inhibidor de u-PA, su sobreexpresión reduce el desarrollo metastásico de células de tumor <sup>(86)</sup>, estudios realizados *in vitro* en células de melanoma previenen la espontánea metástasis de esas células al ser transplantadas y en células HT-1080 *in vivo* muestra un reducido movimiento celular <sup>(93)</sup>, así mismo la habilidad de PAI-2 para selectivamente unirse a u-PA:u-PAR en la superficie celular, ser internalizado eficiente y rápidamente por endosomas y posteriormente ser degradado en

lisosomas se muestra en estudios realizados en células de cáncer de mama y próstata <sup>(87)</sup>.

La eficiente y rápida formación del complejo u-PA:PAI-2 también está asociada con una específica e inmediata internalización de dicho complejo y posteriormente la desintegración presumiblemente dentro de lisosomas <sup>(94)</sup>.

Como conclusión tanto la proteasa (u-PA) como su inhibidor (PAI-1) se encuentran presentes en el tumor para mediar una proteólisis en forma limitada y efectiva <sup>(10, 81)</sup>, la internalización y reciclamiento del receptor (u-PAR) localiza la proteólisis en la superficie celular <sup>(10)</sup>. La internalización de los receptores forma parte de este proceso de degradación de la matriz extracelular como un paso importante en la invasión del cáncer <sup>(63)</sup>, PAI-2 es el inhibidor selectivo de u-PA unido a la membrana celular y eficiente en reducir el desarrollo de metástasis.

### **3.5. APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN EL CÁNCER**

Dada la dual funcionalidad del sistema del plasminógeno (proteolítico y no proteolítico) se ha iniciado el interés por evaluar su significado clínico en pacientes con tumores malignos.

Como se discutió previamente, las interacciones no proteolíticas y de señalización del sistema de activación del plasminógeno nos dan mas evidencia de su critica participación en la invasión del cáncer y metástasis <sup>(94, 95, 96)</sup>.

En cáncer, la precisa regulación del sistema del plasminógeno parece haberse perdido o modificado, estudios realizados demuestran la particular participación de

u-PA en las propiedades invasivas y metastásicas del tumor maligno e incluyen una correlación entre la transformación del oncogen y un alto incremento en la síntesis de plasmina, sus activadores e inhibidores,(u-PA y PAI-1, que cooperan en el proceso migratorio al facilitar la adhesión y la posterior liberación de vitronectina en la matriz extracelular), los altos niveles de u-PA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 muestran un gran significado pronóstico en muchos tipos de cánceres. Todos los datos revisados anteriormente invitan al uso clínico de estos factores proteolíticos, tanto como agentes de diagnóstico y marcadores pronóstico, así como en estrategias terapéuticas contra el cáncer.

El principal objetivo de esta revisión ha sido establecer la biología del sistema de proteasas del sistema fibrinolítico, posteriormente encontrar su uso clínico en el cáncer.

Durante las dos últimas décadas, un agobiante numero de reportes demuestran la importancia del sistema del plasminógeno en el desarrollo del cáncer y su progresión, Duffy en 1987 fue el primero en establecer que las proteasas tenían que ver con los eventos de crecimiento y diseminación del tumor <sup>(129)</sup>, posteriormente un considerable numero de estudios ha evaluado el valor pronóstico de estas proteasas en muchos tipos de cánceres humanos.

En el espacio de esta tesis es imposible revisar todos los datos que describen el efecto de los diferentes componentes del sistema fibrinolítico en estos procesos, se muestran revisiones desde 1987 a la fecha, resumidos en la tabla 4.

La importancia clínica encontrada en estos estudios nos indica que valores altos de estos elementos se relacionan con pobre pronóstico de la enfermedad y

corta supervivencia libre de recaída, son pacientes con riesgo de sufrir invasión y metástasis del tumor, clasificando al paciente como candidato a terapia coadyuvante sistémica.

Tabla 4. Importancia Clínica de los componentes del sistema del plasminógeno en cánceres humanos.

Cáncer	referencia	Autor	Año	Factor	Conclusión
Neuroblastoma	107	Li P y cols	2004	uPA, uPAR	Nuevos marcadores pronóstico permiten identificar pacientes para tratamientos
Cavidad Oral	108	Hundsorfer B y cols	2005	uPA y PAI-1	Factores pronóstico Independientes seleccionando pacientes para tratamiento coadyuvante
Laringe	109	Sierko E y cols	2003	uPAR, PAI-1 PAI-2, PAI-3 HMW-UK	Activación Fibrinolisis que contribuye al depósito de fibrina en el tumor
	110	Zhao EM y cols	2003	uPA, PAI-1 PAI-2	u-PA y PAI-2 nuevos factores pronóstico independientes. PAI-2 buen pronóstico
Esófago	111	Tang WH y cols	2001	uPA, uPAR PAI-1	Factores pronóstico No útiles para este carcinoma
Pulmón	112	Pedersen H Y cols	1994	uPA, PAI-1	PAI-1 buen factor pronóstico en selección de pacientes
Páncreas	113	Harvey SR y cols	2003	uPA, uPAR	Potencial factor pronóstico
Hepatocelular	114	Sheng Q y cols	2000	uPA, uPAR PAI-1	Factores pronóstico
Gástrico	115	Nekarda H y cols	1994	uPA, PAI-1	Factor pronóstico en supervivencia
	116	Beyer. BC y cols	2006	uPA, PAI-1	Factores pronóstico independientes
Gastro intestinal	117	László H y cols	2000	uPA	Fuerte valor pronóstico
Colorectal	118	Gandolfo,GM y cols	1996	uPA, PAI-1 uPA:tPA:PAI-2	Marcadores de importancia clínica supervivencia del paciente
Colon	119	Berger D. H	2002	uPA, uPAR PAI-1 PAI-2	Marcadores pronóstico en suero y tejido del tumor

Continuación tabla 4.

Cáncer	Referencia	Autor	Año	Factor	Conclusión
Vejiga	120	Shariat S F y cols	2003	uPA, uPAR NMP22	Factores pronóstico y diagnóstico.
	121	Shariat SF y cols	2003	uPA, uPAR	Factor pronóstico independiente en niveles séricos
Ovario	122	Ho C H Y cols	1999	t-PA. UPA. uPAR, PAI-1 y PAI-2	Valores plasmáticos PAI-1 correlacionan con enfermedad
	123	Schmalfeldt, B y cols	1995	UPA, uPAR, PAI-1 PAI-2	Elevados niveles en el tumor agresividad del cáncer y metástasis
	124	Konecny G y cols	2001	uPA PAI-1	Buenos factores pronóstico
Cervical	125	Hazelbag. S y cols	2004	PAI-1 TGB-b	PAI-1 factor pronóstico independiente
Próstata	126	Miyake, H y cols	1999	uPA, uPAR	Factores pronóstico altos niveles en suero o tisular
	127	McCabe NP y cols	2000	s-uPAR PSA suero	Factor pronóstico para detección temprana y valor predictivo
	128	Pakneshan P y cols	2005	uPA	Potencial diagnóstico y pronóstico
Mama	159	Grondhal-Hansen J y col	1993	uPA, PAI-1	Factor pronóstico
	118	Gandolfo GM y col	1996	uPA, PAI-1 PAI-2	Marcadores pronóstico para selección terapia
	128	Pakneshan, P y col	2005	uPA	Potencial diagnóstico y pronóstico terapéutica
	129	Duffy MJ y cols	1988	uPA	Nuevo factor diagnóstico y pronóstico
	130	Duffy MJ y cols	1990	uPA	Marcador pronóstico independiente
	131	Janicke F y cols	1990	uPA	Independiente marcador
	132	Foekens JA y cols	1992	uPA	Valores altos recurrencia y mal pronóstico
	133	Janicke F y cols	1993	PAI-1, uPA	Fuertes e independientes factores pronóstico en pacientes nódulos negativos
	134	Duffy MJ y cols	1994	uPA	Significante marcador pronóstico en pacientes nódulos negativos

Continuación Tabla 4.

Cáncer	Referencia	Autor	Año	Factor	Conclusión
Mama	10	Dano K y cols	1994	uPAR, uPA PAI-1 Colagenasas tipo IV, Estromelisina	Factores pronóstico asociados con pobre supervivencia en este tipo de cáncer
	104	Foekens JA y cols	1995	PAI-2	Su expresión indica favorable relapso y sobrevivencia
	105	Rozenendaal V y cols	1996	uPA	Significante marcador pronóstico
	135	Shiba E y cols.	1997	uPA,	Significante factor pronóstico
	106	Schmitt, M y cols	1997	uPA, uPAR PAI-1	Factores pronóstico
	136	Ozyilkan O y cols	1998	T:ATIII $\alpha_2$ AP:Pln	En cáncer activo hay activación del sistema fibrinolítico
	137	Prechtl A y cols	2000	uPA, PAI-1	Factores pronóstico en pacientes nódulo negativos, selección terapia
	138	McCarthy M	2000	PAI-1 uPA	Factores pronóstico en paciente nódulo negativos para terapia
	139	Sten-Linder, M y cols	2001	PAI-1/ uPA complejo	Es mejor valor pronóstico que PAI-1 o pro-uPA
	139"	Harbeck N y cols	2001	PAI-1, uPA	Impacto pronóstico en nódulo negativos
	140	Look MP y cols	2002	PAI-1 uPA	Fuerte valor pronóstico en estrategia terapéutica en nódulo negativos
	141	Duffy MJ	2002	uPA PAI-1	Impacto pronóstico en pacientes nódulo negativos
	142	Bornstnar S y cols	2002	uPA,uPAR PAI-1,PAI-2	Valores pronóstico apropiados para tratamiento individual
	143	Remedios C y cols	2002	uPA PAI-1 TIMP-1	Factores asociados a pobre pronóstico
	144	Thomssen C y cols	2003	uPA PAI-1	Valor pronóstico en nódulo negativos designar tratamiento individual
	145	Qin W Y cols	2003	uPA uPAR PAI-1	uPA y PAI-1 útiles como no invasivos marcadores biológicos en detección
	146	Harbeck N Y col	2003	PAI-1 uPA	Factores pronóstico y en respuesta a terapia coadyuvante

Continuación tabla 4.

Cáncer	referencia	Autor	Año	Factor	Conclusión
Mama	147	Schneeweis, A y cols	2003	uPA PAI-2	Nuevos marcadores biológicos en aplicación clínica
	159	Cufer, Tanja	2004	uPA, PAI-1	Marcadores útiles en selección candidatos a terapia sistémica
	148	Manders, P y cols	2004	uPA:PAI-1 complejo	Factor pronóstico en terapia pacientes con tumor primario
	149	Duffy, M.J.	2004	uPA PAI-1	Ayudan identificar a pacientes nódulo negativos de bajo riesgo cuya terapia es innecesaria
	150	Manders, P. y col	2004	uPA: PAI-1 complejo	Asociado con pobre pronóstico correlaciona con status de receptores de progesterona y estrógenos
	151	Grebentchikov, N y cols	2005	uPA,PAI-1, uPA:PAI-1 y uPAR	La determinación en plasma no refleja su concentración tisular. Valores en plasma no se recomienda para pronóstico en este cáncer
	152	Xiao, J. P. y cols	2005	uPA, MVD	Marcadores biológicos independientes , predicen recaída y metástasis en este cáncer
	153	Molina, R y cols	2005	uPA, PAI-1	Marcadores pronóstico seleccionan pacientes nódulos negativos de bajo riesgo.
	154	Decock, K. y cols	2005	uPA, PAI-1	Uso en la clínica práctica para selección de candidatos a terapia sistémica coadyuvante
	155	Schmitt M y cols	2006	uPA, PAI-1	Uso clínico, identificar riesgo de recaída, nuevo micrométodo.
	156	Weissenstein, U y cols	2006	uPA, PAI-1 VEGF	Nuevo método para determinar marcadores de cáncer en muestras pequeñas de biopsias

MVD densidad microvascular, VEGF factor de crecimiento vascular endotelial, NMP22 proteína 22 de la matriz nuclear urinaria.



Al revisar los datos de la tabla 4, encontramos que las proteasas u-PA y PAI-1 son los primeramente estudiados y mas comunes factores pronóstico proteolíticos en muchos tipos de cáncer incluyendo mama, próstata, colorectal, vejiga, pulmón, etc. <sup>(108, 112, 115, 118, 121, 124, 137, 138,139)</sup> , posteriormente se investiga la expresión del receptor de u-PA (u-PAR) en cáncer de mama, colon, piel y otros tipos de cáncer <sup>(129, 10,107, 113, 120, 122, 123, 126, 127)</sup> , encontrándose también utilidad como factor pronóstico.

Nekarda y colaboradores, estudiaron el impacto pronóstico de u-PA y PAI-1 en 76 pacientes con cáncer gástrico en extracto del primer tumor donde niveles altos de u-PA y PAI-1 correlacionaron con invasión vascular y disminución en la sobrevivencia, concluyeron que la positividad sirve como un nuevo marcador pronóstico en este tipo de cáncer prediciendo la corta sobrevivencia <sup>(27)</sup>. Similares estudios fueron realizados en cáncer de ovario por B, Schmalfeldt y colaboradores y encontraron que altos niveles en el tumor contribuyen a la agresividad del cáncer <sup>(123)</sup>, Gandolfo y col <sup>(118)</sup> al estudio en cáncer de colon concluyeron como marcadores pronóstico, entre otros.

PAI-2 actualmente ha sido estudiado por muchos investigadores y su elevación nos indica buen pronóstico, libre de recaída y sobrevivencia <sup>(109, 110, 118, 119, 122, 142)</sup>.

Dano y col reportaron el patrón celular de expresión de seis moléculas involucradas en la regulación y generación de la proteólisis extracelular y parece ser característico de cada tipo de cáncer. El patrón de expresión de u-PAR, u-PA, PAI-1 y tres metaloproteasas en cáncer de colón, mama y células escamosas de la piel son

expresados en las mismas células o en las células adyacentes para reclutar e inducir la invasión y crecimiento del tumor, teniendo una función paracrina <sup>(10)</sup>.

Todos los datos existentes nos revelan el fuerte valor pronóstico de estos factores proteolíticos últimamente desarrollados y parece ser el más aceptado como agentes de diagnóstico y pronóstico independientes de otros factores existentes en una amplia variedad de cánceres. En pacientes con cáncer, el incremento de estos biomarcadores se asocia con progresión del tumor y corta supervivencia libre de la enfermedad <sup>(106)</sup>.

### 3.6. FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la más común malignidad en mujeres de todo el mundo, más de un millón de mujeres son diagnosticadas con esta enfermedad cada año <sup>(101, 102)</sup>.

En el mundo occidental, una de cada 8 a 10 mujeres pueden presentar cáncer de mama en una etapa de su vida <sup>(106)</sup>. Durante las últimas décadas, se han hecho grandes mejoras en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, llevando a rangos de supervivencia del 50% al 70% en cáncer operable, cuando la detección de la enfermedad es temprana y la introducción de terapia sistémica es a tiempo <sup>(106)</sup>. Las pacientes cuyos nódulos linfáticos están cargados de células tumorales pueden recibir algún tipo de terapia coadyuvante (pacientes con riesgo de sufrir metástasis) y evitar la recaída <sup>(105, 106)</sup>.

Un factor pronóstico en cáncer de mama se define como la medida capaz de diagnosticarlo y predecir la supervivencia sin la enfermedad. Los tradicionales factores pronóstico utilizados para separar pacientes con nódulos negativos en grupos de bajo riesgo y grupos de alto riesgo en pacientes con nódulos positivos de acuerdo a la recurrencia de la enfermedad se clasifican como parámetros histomorfológicos (tamaño del tumor, grado nuclear), otros factores como estatus de receptores hormonales de esteroides y fracción de la fase-S <sup>(98,99,106,163)</sup>; son considerados como los factores pronóstico estándar de acuerdo a lo cual se planea la terapia coadyuvante; su valor pronóstico ha sido confirmado en muchos estudios en cánceres tempranos y son reconocidos desde 1999 en la conferencia bajo el auspicio del colegio de patólogos americanos <sup>(102)</sup>. Según estos factores el 90% de

los pacientes caen en alto riesgo y requieren de terapia sistémica, el 10% restante es un grupo de menor riesgo al cual se le deja sin terapia. De éste grupo aproximadamente el 70% de pacientes nódulo negativos son curados de su enfermedad por cirugía y radioterapia, mientras que el 30% tienen recaída dentro de los diez años siguientes. Estos factores pronóstico utilizados no son suficientemente sensibles para identificar el subgrupo de pacientes con enfermedad recurrente <sup>(111)</sup>, es necesario un manejo individualizado para un mejor resultado <sup>(98)</sup>. Los factores proteolíticos (u-PA, metaloproteasas, catepsinas, inhibidores y receptores) han ganado aceptación clínica, estos nuevos factores tumorales biológicos parecen tener un mejor pronóstico <sup>(100,106,154,155)</sup>.

Biomarcadores son indicadores biológicos de enfermedad o efectos terapéuticos, los cuales pueden ser medidos por pruebas en sangre, líquidos biológicos u otras muestras <sup>(141)</sup>.

Al aplicar la determinación de estos factores proteolíticos (u-PA, u-PAR y PAI-1) en tejido de pacientes con cáncer de mama, la elevación de alguno de estos factores en su tumor primario indica un elevado riesgo a desarrollar metástasis <sup>(101, 106)</sup> ya que la principal causa de enfermedad y muerte en estos pacientes son la formación de metástasis. El proceso de metástasis como se ha revisado anteriormente envuelve la invasión local, degradación de la matriz extracelular, angiogénesis, intravasación, evasión de la apoptosis y sobrevivencia en la circulación, extravasación y crecimiento del tumor en un sitio secundario, uno de los principales mediadores de este proceso es la serín proteasa u-PA <sup>(141,157)</sup>.

Duffy y sus colaboradores en 1988, fueron los primeros en describir una significativa correlación entre elevados niveles de la enzima u-PA en extractos de tejido del tumor primario de cáncer de mama y progresión del cáncer <sup>(129)</sup>. Independientemente de los hallazgos de Jänicke y Duffy en 1989/90, Foekens y Gribdagk-Hansen, lo confirmaron más tarde al determinar un antígeno de u-PA que parecía ser un fuerte factor pronóstico independiente de los tradicionales <sup>(132)</sup>. En 1991 Jänicke y sus colaboradores <sup>(106, 131)</sup> reportaron que niveles altos de PAI-1 en tumor primario también correlacionaban con pobre pronóstico en estos pacientes; dichos resultados fueron después comprobados por otros investigadores, encontrándose que es un factor pronóstico independiente, útil para cáncer de mama <sup>(118, 137 - 155)</sup>.

La elevación de los niveles de u-PAR en el tumor primario también indica mal pronóstico, este pronóstico sin embargo es menos relevante que PAI-1 <sup>(129, 142, 145, 150)</sup>. En contraste al elevarse PAI-2 indica buen pronóstico <sup>(106, 142, 153)</sup>.

Los datos de la investigación básica pueden ayudar a explicar el hallazgo de PAI-1, siendo que éste no actúa como un inhibidor verdadero pero sí como un factor proteolítico, PAI-1 es indispensable para una óptima proteólisis local, adhesión y migración de las células del tumor <sup>(55, 104)</sup>.

Recientes observaciones de Kanse <sup>(39)</sup>, Stefansson y Lawrence indican que PAI-1 puede modular la unión de u-PAR con los componentes de la matriz extracelular e interferir con su adhesión a la misma. Estas características ponen a las células del tumor en posición de migrar de una manera alterarnativa uniéndose o desuniéndose a la matriz extracelular. Estas características reconocen el fuerte

efecto de PAI-1 en el fenotipo celular maligno y ponen de manifiesto que para focalizar una óptima invasión debe de haber expresión de los tres factores, u-PA, UPA-R y PAI-1 así como también para la actividad angiogénica <sup>(55, 106)</sup>.

Chazaud B y cols demostraron que el complejo u-PAR:u-PA:PAI-1 se une a LRP y transitoriamente une la membrana de la célula con la matriz extracelular formando un puente, utilizando este complejo para migrar, los efectos promigratorios son la expresión PAI-1 en la ECM <sup>(55)</sup>.

Es de notar que el inhibidor PAI-2 actúa de forma diferente, al formar el complejo con u-PA no es internalizado después de unirse al receptor en la célula tumoral sino hidrolizado. Existe también evidencia de que una función biológica alterna de PAI-2 es como factor importante en regular la muerte celular en un proceso mediado por TNF- $\alpha$  a través de la proteinasa que induce apoptosis <sup>(12)</sup>.

El valor pronóstico independiente de u-PA y su inhibidor PAI-1 en cáncer de mama ha sido confirmado en un meta análisis, en el que se incluyó un conjunto de 18 datos, 8377 pacientes dentro de un seguimiento de 6.5 años. En éste estudio, la combinación de ambos factores fué reforzada como factores pronóstico en pacientes con nódulo negativos, independiente de la cirugía, años de cirugía, estado de menopausia y estado de nódulos linfáticos <sup>(140)</sup>.

El valor pronóstico independiente de éstos factores también ha sido corroborado por muchos otros autores en estos últimos años <sup>(142 - 157)</sup>.

Estudios donde se analizaron varios factores tradicionales (tamaño y grado del tumor, receptores hormonales fase S, M1B1, p53, Her-2) y los factores biológicos (u-

PA, PAI-1, cathepsina D) en pronóstico de supervivencia en un lapso de 76 meses, solamente u-PA, PAI-1 así como los marcadores de proliferación fueron estadísticamente significantes de supervivencia libre de la enfermedad<sup>(106)</sup>.

En un estudio realizado en 1990 por M. Duffy y colaboradores <sup>(130)</sup>, u-PA en pacientes con cáncer de mama y comparando con otros factores tradicionales de riesgo como nódulos axilares, tamaño del tumor o receptor de estradiol, u-PA resulto ser un marcador pronóstico de sobrevivencia de la enfermedad similar en fuerza al status en nódulos axilares y más eficaz e independiente de los otros factores.

Otros investigadores como Foekens y colaboradores en un estudio de 671 pacientes con tumores de mama en primer estadio, con altos niveles de u-PA evaluaron la supervivencia libre de la enfermedad al asociarlo con edad, menopausia, nódulos linfáticos positivos o negativos, tamaño del tumor y receptores de estrógenos y progesterona, la positividad de u-PA se asoció significativamente con incremento en relapso y muerte. En subgrupos de u-PA positivo asociado con nódulos positivos, nódulo negativos, postmenopausia y receptores de hormonas se concluye que la positividad de u-PA en el tumor primario es un factor importante e independiente<sup>(132)</sup>.

Michael McCarthy estudiaron u-PA y PAI-1 como indicadores de riesgo de recurrencia en pacientes nódulo negativos en 556 pacientes siendo 241 con niveles bajos, clasificadas como pacientes de bajo riesgo, los cuales no tuvieron recaída después de 32 meses de seguimiento, mientras que 315 pacientes fueron pacientes de alto riesgo al encontrarles niveles altos de ambas proteínas <sup>(138)</sup>.

Shiba E. y colaboradores en estudio realizado a 226 pacientes con tejidos de cáncer de mama donde se determina u-PA y se correlaciona con otros factores pronóstico se llega a la misma conclusión de la importancia de u-PA <sup>(135)</sup>.

El estudio realizado por Schmitt M. Thomssen donde se observa el pronóstico en un lapso de tiempo, u-PA y PAI-1 y el receptor hormonal en tejido de tumor primario de cáncer de mama, donde u-PA disminuye constantemente sobre el tiempo siendo fuerte su impacto en los 3 primeros años, especialmente en pacientes nódulo negativo pero declinó substancialmente al final, este comportamiento fué el mismo que el estatus de receptor hormonal de esteroides. En contraste el pronóstico de PAI-1 incrementó sobre el tiempo de igual manera que el valor pronóstico de nódulos linfáticos <sup>(106)</sup>.

Otro estudio realizado por Janicke y colaboradores donde se observa el comportamiento de u-PA y PAI-1 en pacientes sometidas a terapia coadyuvante con tamoxifén, pacientes con u-PA negativo en el tejido del tumor primario tuvieron mejor respuesta al tamoxifén que cuando tenían elevado el valor. Se concluye que pacientes con u-PA y PAI-1 positivos muestran más corta supervivencia libre de relapso y responden menos a la terapia con tamoxifén <sup>(131)</sup>.

Gandolfo y colaboradores en un estudio pacientes con cáncer de mama y carcinoma de colon concluye la importancia de los niveles tisulares de los activadores e inhibidores del plasminógeno con respecto al desarrollo del cáncer y la supervivencia de los pacientes afectados por estas patologías y que estos marcadores nuevos pueden permitir una mejor selección de los mismos para una mejor opción en un posible tratamiento coadyuvante <sup>(118)</sup>.



John A Foekens y cols al estudiar PAI-2 y u-PA en 1012 pacientes con cáncer de mama y al compararlo a PAI-1, concluye que la elevación de PAI-2 aún con valores altos de u-PA reduce la posibilidad de recaída y aumenta la supervivencia libre de enfermedad, explicando que PAI-2 inhibe totalmente a u-PA, en pacientes con u-PA no elevada o nula y la presencia de PAI-2 se encontró como un buen pronóstico <sup>(104)</sup>.

En otros estudios, Roozental y col en tejido de carcinoma mamario ductal invasivo encontraron una población de macrófagos en el tejido periductal (células estromales similares a macrófagos) y neutrófilos que infiltran dicho tejido así como vasos sanguíneos del tumor que expresan u-PAR, estas células son actualmente identificadas como miofibroblastos,  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -sm). Los miofibroblastos constituyen mas del 80 % de las células estromales en el cáncer ductal de mama, se originan de fibroblastos diferenciados y están ausentes en tejido mamario normal. Las células cancerígenas inducen a los fibroblastos del tumor a producir u-PA y esto parece coincidir con la conversión de los fibroblastos mamarios a miofibroblastos <sup>(105)</sup>.

Estudios de componentes del sistema fibrinolítico en plasma de mujeres con cáncer de mama también han revelado algunos datos importantes para utilizar dichos componentes como marcadores tumorales. La determinación de u-PA, u-PAR y el complejo (t-AP:PAI-1) en plasma revelan un incremento solamente en el complejo (t-PA:PAI-1) como consecuencia de aumento en la fibrinólisis, estos mismos estudios comparados en extracto tumoral revelan un aumento en los tres parámetros determinados <sup>(52)</sup> mientras que Grebenchtchikov N y col. al estudiar los

factores u-PA, PAI-1 y el complejo u-PA:PAI-1 concluyeron que la determinación en plasma no correlaciona con los valores tisulares, por lo que la determinación en plasma no se recomienda para pronóstico en cáncer de mama <sup>(151)</sup>.

La determinación del complejo  $\alpha_2$ -antiplasmina-plasmina en plasma, realizado por Ozyilkan y col en 1998, al mismo tiempo que lo compararon con el marcador CA 15-3, el más conocido antígeno para cáncer de mama, aportó resultados significativamente elevados comparados con otros grupos sanos y hubo una pobre pero positiva correlación con el antígeno, con lo que se demuestra que un incremento en el complejo  $\alpha_2$ -antiplasmina-plasmina indica activación en el sistema fibrinolítico en dichas pacientes con cáncer activo <sup>(136)</sup>.

E. Rondahl-Hansen, G. Hoyer-Hansen, T. Plesner, N:E: Hansen, K. Dano, (resultados no publicados) encontraron niveles tisulares elevados de los complejos u-PA:u-PAR y u-PAR:u-PA:PAI-1 y sus variantes hidrolizadas u-PAR (II+III), concluyendo que pueden servir como parámetros pronósticos, pues reflejan la actividad del sistema de u-PA. Así mismo los niveles en suero de u-PAR pueden ser un valor diagnóstico.

Una forma soluble de u-PAR ha sido recientemente encontrada en plasma, en pacientes con ciertos tipos de cáncer se encuentra elevado, su función se cree antagoniza la progresión del cáncer; sin embargo los mecanismos *in vivo* hasta la fecha permanecen en estudio. <sup>(10, 52)</sup>.

Como se ha demostrado en todos los estudios realizados, la distribución celular de u-PA, u-PAR y PAI -1 en tejido de cáncer de mama ha sido bien estudiado

por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* con RNAm por varios investigadores. Igual que en otros tipos de cáncer, también en tejido mamario las proteínas proteolíticas se expresan y sintetizan por una variedad de células de tumor y células del huésped incluyendo fibroblastos, células endoteliales y macrófagos. Estos factores proteolíticos son de gran interés en la invasión del tumor, angiogénesis y metástasis. Las pacientes con factores de riesgo alto pueden ser también identificadas por estos factores y ser tratadas más individualmente con terapia coadyuvante <sup>(10)</sup>.

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) de alta sensibilidad se encuentran disponibles en el mercado y métodos cuantitativos con transcripción reversa PCR han sido también desarrollados para la cuantificación de u-PA, u-PAR, PAI-1 y PAI-2 y en tejidos de cáncer de mama de diferentes compañías <sup>(106)</sup>.

### 3.7. ALTERACIONES DEL SISTEMA FIBRINOLITICO POR MEDICAMENTOS

Además de los agentes hemostáticos que actúan directamente como activadores del plasminógeno muchos medicamentos son capaces de producir efectos profibrinolíticos que son mediados por mecanismos endógenos indirectos.

Los efectos fibrinolíticos pueden ser generados por la liberación de t-PA endógeno de varios sitios celulares, la reducción de PAI debido a procesos regulatorios, la modificación de serina proteasas en el proceso de fibrinólisis, la modificación de la molécula de fibrinógeno y la sobre regulación de las proteínas fibrinolíticas <sup>(158)</sup>.

Varios medicamentos ejercen un efecto de estimulación en el endotelio facilitando la liberación de activadores del plasminógeno tanto tisular como tipo uroquinasa, los cuales ejercen efectos líticos tanto sistémicos como localizados. Inicialmente los efectos indirectos profibrinolíticos no son detectables por métodos convencionales tales como el nivel del fibrinógeno y el tiempo de lisis de euglobulinas, se requieren de métodos de laboratorio ultrasensibles para determinar los parámetros del sistema fibrinolítico cuando esta activado subclínicamente, la tabla 5 lista algunos de los factores que contribuyen a un estado fibrinolítico <sup>(158)</sup>.

---

Determinantes de un estado fibrinolítico.
Reducción de inhibidores fibrinolíticos
Incremento de activadores fibrinolíticos
Modificación de sustratos y enzimas
Liberación de activadores endógenos de algún sitio vascular
Moduladores celulares
Respuestas mediadas por Citocinas
Liberación de mediador

---

Tabla 5. Determinantes de un estado fibrinolítico

Los mecanismos por los cuales los agentes quimioteráuticos son capaces de producir un estado fibrinolítico son múltiples, una reducción tanto farmacológica como en su función o una disminución de sus niveles produce un estado profibrinolítico <sup>(158, 159)</sup>.

Muchos medicamentos son capaces de modificar la molécula de fibrinógeno haciéndola más susceptible a la acción de la plasmina. Del mismo modo, enzimas como la plasmina, activadores del plasminógeno tisular y uroquinasa también pueden ser modificados, siendo más eficientes y potencializando el proceso de fibrinólisis <sup>(158)</sup>. Estímulos físicos y agentes farmacológicos son capaces de liberar activadores endógenos, esta activación endógena aumenta la fibrinólisis <sup>(159)</sup>.

Muchos medicamentos son capaces de afectar los sitios celulares donde ambos los activadores y los inhibidores de la fibrinólisis se producen. Algunas de estas drogas se conocen para potenciar el sistema fibrinolítico mientras que otras producen una acción inhibitoria <sup>(158, 159)</sup>.

Las células endoteliales y los fibroblastos producen varios moduladores que contribuyen significativamente a la regulación del proceso fibrinolítico por drogas. Liberación de activadores e inhibidores del plasminógeno de sitios de almacén vascular por acción de agentes farmacológicos es bien documentado en la actualidad <sup>(158)</sup>.

La tabla 6 muestra algunos agentes farmacológicos que producen variables efectos en el sistema fibrinolítico. Glucosaminoglicanos, tales como la heparina y el dermatán, produce efectos profibrinolíticos. Estos agentes facilitan la liberación endógena de t-PA y aumentan la generación de varios mediadores profibrinolíticos

dentro de la circulación. Los efectos de los glucosaminoglicanos puede tener un mayor impacto en el manejo de trastornos tromboembólicos. La heparina es utilizada en algunas patologías hematológicas para el tratamiento y profilaxis de la trombosis. La heparina y sus derivados pueden inducir activación subclínica de la fibrinólisis, lo cual puede aumentar las complicaciones por hemorragia. La seguridad y eficacia de otros agentes farmacológicos se pueden ver influenciados por este anticoagulante, por lo que su uso combinado debe ser considerado especialmente y tomarse en cuenta en estados patológicos.

La estimulación endotelial de agentes tales como desmopresin (DDAVP) y péptidos relacionados, aumentan en forma endógena la fibrinólisis. DDAVP, un facilitador vascular, incrementa los niveles endógenos de t-PA y aumenta la eficacia lítica de la estreptoquinasa. Un ácido nucleico derivado, desfibrotide, también actúa como modulador al aumentar la liberación endógena de activadores del plasminógeno. Este agente es también capaz de producir una disminución en los títulos de los inhibidores de los activadores del plasminógeno <sup>(158)</sup>.

Algunos análogos estables de prostaciclina son capaces de incrementar la fibrinólisis. El mecanismo por el cual estos agentes producen su acción no es bien conocido. Varios polielectrolitos tales como dextrán sulfato, polisulfato de pentosan y otros agentes similares promueven la fibrinólisis. Algunos de estos son utilizados en medicina cardiovascular, y su efecto terapéutico puede afectar el sistema fibrinolítico <sup>(159)</sup>.

Medicamentos	Modulación
Glucosaminoglicanos (heparinas, dermatán sulfatos)	Efectos profibrinolíticos, sinergismo de t-PA, reducción de PAI
Antibióticos	Efectos pro y antifibrinolíticos
Nitratos	Promoción de fibrinólisis
Hormonas	Promoción de fibrinólisis
Defibrótide	Efectos profibrinolíticos
Prostaciclina y agentes relacionados	Sinergismo interacción con t-PA
Polímeros (dextranes, SP 54)	Efectos profibrinolíticos
Concentrados de complejos de protrombina	Aumento de Fibrinólisis
Bloqueadores de canales de Calcio	Promoción de fibrinólisis
Metilxantinas	Promoción de fibrinólisis
Angiotensina que convierte enzimas inhibidores	Promoción de fibrinólisis

Tabla 6. Medicamentos que modulan el Sistema Fibrinolítico <sup>(158)</sup>.

Muchos de los productos derivados de plasma humano también alteran el sistema fibrinolítico, la composición de cada uno de estos productos juega un importante papel en su actividad, el plasma fresco congelado, crioprecipitados y plasma rico en plaquetas contienen muchos moduladores del sistema fibrinolítico que pueden aumentar o disminuir su función. En la tabla 7 se muestran estos productos y sus acciones.

La proteína C al ser activada por el complejo trombina-trombomodulina facilita la fibrinólisis. El inhibidor Esterasa C-1 puede modular la actividad de la plasmina y otras enzimas profibrinolíticas. El concentrado de complejo de protrombina contiene significantes cantidades de proteína C, por lo que también produce activación del sistema fibrinolítico. Concentrados de Factor VIII puede tener varios efectos, son pro

hemostáticos y puede tener una acción regulatoria negativa en el sistema fibrinolítico <sup>(158)</sup>.

La albúmina, globulina y concentrados de amino ácidos también modulan este sistema, las globulinas pueden producir efectos graves porque muchos componentes y moduladores son contenidos en esta fracción.

A pesar de reportes en la modulación del sistema fibrinolítico por productos de plasma humano no existe un estudio sistemático de la acción de estos agentes <sup>(158)</sup>.

Productos de Plasma	Acciones Profibrinolíticas	Interacciones con Agentes Trombolíticos
Plasma Fresco	±	+
Congelado		
Crioprecipitados	+	±
Antitrombina III	-	-
Proteína C	+	-
Inhibidor C-1	-	-
Esterasa		
Complejos	+	+
Protrombina		
Complejo de Protrombina activado	+	±
Concentrado de Factor VIII	±	-
Albúmina	-	-
Globulinas	-	±
Mezcla de amino ácidos	±	±

Tabla 7. Modulación del Sistema Fibrinolítico por Productos derivados de Plasma.

La tabla 8 muestra varios marcadores de activación subclínica de la fibrinólisis que recientemente se consideran. Algunos agentes farmacológicos pueden producir liberación endógena de antígeno de t-PA y u-PA, los cuales son detectados rápidamente al utilizar métodos de ELISA.



$\alpha_2$ -antiplasmina puede ser determinada funcionalmente, sin embargo, esto no representa un verdadero nivel fisiológico en la fibrinólisis, la determinación de complejos nos revela el estado fisiológico más cercano al real, estos métodos determinan cuantitativamente microgramos del complejo plasmina- $\alpha_2$ -antiplasmina.

La activación de la proteína C y el plasminógeno pueden ser medidos por métodos que miden la activación de péptidos, estos péptidos son parecidos a fibrinopéptido A y pueden proveer un índice más seguro para la conversión de estos zimógenos en enzimas activas.

Una vez que la plasmina se genera, digiere el fibrinógeno y la fibrina en sus respectivos productos de digestión, los cuales también pueden ser cuantificados. Los efectos clínicos de muchos nuevos agentes farmacológicos no han sido bien estudiados ya que observaciones hechas en diferentes modelos animales tienen un comportamiento diferente a los humanos.

---

Antígeno t-PA  
Antígeno u-PA  
Complejos t-PA-PAI (inhibidor del activador)  
Complejos u-PA-PAI  
Péptido de activación proteína C  
Péptido de activación de plasminógeno  
Complejo Plasmina- $\alpha_2$ antiplasmina  
Péptidos B $_{\beta}$   
Productos de digestión del Fibrinógeno  
Productos de digestión de la Fibrina  
Dímero-D

---

Tabla 8. Marcadores moleculares de la activación fibrinolítica <sup>(158)</sup>.

Los agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer producen una gran variedad de efectos en el sistema hemostático (en el sistema de la coagulación, del complemento, Kalicreina-Kinina y fibrinolisis).

Agentes anticancerígenos tales como metotrexate, purina y análogos a la pirimidina, alcaloides de vinca y nitrosa urea producen varios grados de inhibición del sistema hemostático. Cuando estos agentes son administrados en forma de quimioterapia combinada sus efectos en la coagulación son más complejos y el resultado va a depender de los factores que predisponen al paciente en sí. Durante el curso de la quimioterapia del cáncer, es importante vigilar parámetros de la hemostasia que provean información en alguna alteración del sistema hemostático

(36).

## CAPITULO 4

### METODOS DE ESTUDIO DE LA FIBRINOLISIS

Los episodios de fibrinólisis en el organismo pueden ser eventos prolongados, sostenidos, generalizados o locales. Si son sostenidos y generalizados su identificación es sencilla, estos pacientes presentan hemorragia debida a fibrinólisis sistémica, y se puede encontrar evidencia de incremento de plasmina o activador del plasminógeno en la circulación sanguínea que pueden ser identificados por técnicas simples: <sup>(40, 47)</sup>

- Tiempo de lisis del coágulo en sangre total.
- Tiempo de lisis del coágulo de euglobulinas (aumento de los activadores especialmente el t-PA, el cual no diferencia entre plasmina o activador del plasminógeno).
- Lisis de placas de fibrina que pueden diferenciar plasmina de su activador al utilizar plasminógeno o fibrina libre de plasminógeno.

Si un episodio de fibrinólisis ha sido transitorio o localizado, demostrarlo es más difícil, sólo se puede identificar la presencia de productos de digestión de la fibrina en el suero, aunque no se distingue si provienen de la digestión de la fibrina o del fibrinógeno <sup>(47)</sup>.

Las hemorragias localizadas en algunas áreas u órganos pueden relacionarse con aumento de activadores fibrinolíticos y activación fibrinolítica localizada, sin evidencias de cambios a nivel de sangre sistémica. El hallazgo de aumento de activadores del plasminógeno y/o plasmina y de PDF/f en líquidos de drenaje,

secreciones, orina , etc. es lo que demuestra la fibrinólisis en estas hemorragias. Las técnicas de laboratorio útiles para estos casos son aquellas que proveen sustratos (plasminógeno, fibrina) para poder evidenciar la actividad lítica presente en estos líquidos, tales como placas de fibrina, métodos caseolíticos, sustratos cromogénicos, etc <sup>(40)</sup>.

Un método alternativo para demostrar que existe fibrinólisis *in vivo* es comprobar que se ha formado la plasmina, identificando complejos plasmina- $\alpha_2$ antiplasmina presentes en la sangre <sup>(47)</sup>.

Los estados proteolíticos descritos en carcinomas metastásicos entre otros reflejan la liberación del activador del plasminógeno.

En la hemorragia por fibrinólisis primaria debemos demostrar la presencia de excesivas cantidades de activador del plasminógeno con formación de los complejos plasmina- $\alpha_2$ antiplasmina, disminución de la actividad de antiplasmina con presencia de grave hemorragia en ausencia de otra alteración de coagulación <sup>(40)</sup>.

Una hemorragia fibrinolítica puede ocurrir después de un daño al tejido que contiene grandes cantidades de activador durante la cirugía <sup>(47)</sup>.

Una hemorragia por fibrinólisis secundaria a CID puede ser distinguida por el hallazgo de complejos circulantes de plasmina-- $\alpha_2$ -antiplasmina y fragmento B $\beta$  <sub>15-42</sub> que confirman esta activación, esto junto con los dímeros D-D circulantes apoyarían que la fibrinólisis es secundaria a la formación de fibrina intravascular<sup>(40)</sup>.

Otras pruebas rutinarias que investigan a un paciente con hemorragia, accesibles a un laboratorio de rutina y que pueden reflejar indirectamente la actividad del sistema fibrinolítico al momento de la toma de muestra o en un periodo inmediatamente anterior a dicha toma son pruebas de tamizaje TT, TP y TTPA, que pueden estar prolongados en episodios graves de alteración del sistema fibrinolítico; lo cual se debe a descenso del fibrinógeno plasmático y de otros procoagulantes como los factores V y VIII. Esta situación puede aumentar durante la fibrinólisis primaria aunque también pueden no estar alterados, ser normales; la marcada prolongación de estas pruebas con grave deficiencia del fibrinógeno es común en CID con fibrinólisis secundaria. Una mayor razón de la prolongación de estas pruebas es el efecto anticoagulante de los productos de degradación del fibrinógeno, los cuales pueden impedir la formación de trombina y la interacción trombina-fibrinógeno o la falta de polimerización de la fibrina que prolonga los tiempos de coagulación observados en estas determinaciones. La cuantificación de Fibrinógeno puede ser también en estos casos una prueba de tamizaje <sup>(41)</sup>.

El conteo de plaquetas no es de gran ayuda en muchos casos como son enfermedades malignas que invaden la médula ósea u otras como lupus sistémico, leucemias, cirrosis pues el descenso de plaquetas se ve afectado por el proceso de la enfermedad y no por consumo debido a una coagulación intravascular <sup>(40)</sup>.

Determinaciones más específicas son importantes para diferenciar fibrinólisis primaria o secundaria a CID como las indicadas anteriormente y técnicas que identifican generación de trombina y plasmina aunque no directamente pues ambas son neutralizadas por sus inhibidores rápidamente en el plasma, sino su específica

consecuencia de generación como son los fibrinopéptidos o complejos trombina-antitrombina (T-ATIII), plasmina- $\alpha_2$  antiplasmina, t-PA/PAI 1 entre otros <sup>(47)</sup>.

Para estudiar las alteraciones del sistema fibrinolítico se revisan los diferentes métodos existentes.

Los métodos de laboratorio que estudian la hemostasia los podemos agrupar de acuerdo a sus bases en:

- Coagulométricos
- Cromogénicos
- Inmunoenzimáticos
- Nefelométricos
- Aglutinación
- Diversos

#### **4.1. MÉTODOS COAGULOMÉTRICOS**

Estos miden el tiempo que tarda en formarse un coágulo. Son métodos que utilizan la cascada de enzimas de la coagulación y su punto final es la formación de fibrina. Todos los métodos basados en coagulación pueden ser realizados manualmente, utilizando un tubo de plástico óptimamente limpio e iniciar el tiempo cuando se agrega la mezcla de reactivos con el plasma y el tiempo termina al formarse el coágulo detectado por inclinación del tubo. Es un método altamente subjetivo y requiere de un entrenamiento del técnico adecuado y aún así tiene un alto grado de error.

Existen también métodos automáticos y semiautomáticos utilizando instrumentos electro mecánicos o foto-ópticos que estandarizan más los tiempos y disminuyen el error de los métodos manuales.

Los 3 tipos de instrumentos utilizados en coagulometría son:

- a) Fibrómetros: los cuales se basan en la interrupción eléctrica al haber cambios en la fluidez del plasma a través de un sensor mecánico.
- b) Coagulómetros foto-ópticos: que poseen un sensor foto-óptico sensible a los cambios de luz que se filtran al realizar la prueba.
- c) Coagulómetros nefelométricos: miden también la luz filtrada pero en un ángulo de 70 grados.

Los reactivos que se emplean para valorar la coagulación in vitro son las tromboplastinas, son lipoproteínas de peso molecular aproximado de 37 KD, y constan de dos fracciones:

- 1) proteínica ( que es termolábil )
- 2) lipídica ( que es termoestable)

Las tromboplastinas completas contienen las dos fracciones y se utilizan para realizar el tiempo de protrombina (TP). Las tromboplastinas parciales sólo contienen la parte fosfolipídica y se usan para valorar el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). Se encuentran las tromboplastinas en casi todos los tejidos, cuya mayor concentración están en cerebro, pulmón, placenta, timo y testículo. Las tromboplastinas existentes en el mercado tienen diferente sensibilidad dependiendo de su origen (humano, animal o recombinante) y del método de preparación.

La sensibilidad de la tromboplastina se refiere a la capacidad que tienen el reactivo para detectar las variaciones en la concentración plasmática de los factores de la coagulación, que se expresan en el laboratorio por una mayor diferencia en segundos entre el resultado del testigo contra el problema <sup>(41)</sup>.

El Tiempo de Trombina (TT) : Tiempo en segundos que tarda un plasma citratado en coagular, al agregarle trombina en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica <sup>(41)</sup>.

Explora la conversión del fibrinógeno en fibrina. Valora los trastornos funcionales o cualitativos del fibrinógeno así como la presencia de inhibidores de la trombina o en la interferencia de la polimerización de la fibrina <sup>(41)</sup>.

#### **4.1.a. La cuantificación del fibrinógeno por la técnica de Clauss**

Esta prueba permite evaluar la cantidad y función del fibrinógeno plasmático, aún en concentraciones bajas. Consiste en realizar una curva de calibración haciendo diluciones de un estándar de concentración conocida de fibrinógeno ( por ejemplo de  $240 \pm 40$  mg/dl) a los cuales se les realizan un TT, ( la concentración de trombina de 30 U/ml) mismos que se grafican ( tiempo contra concentración ) y se valora la concentración del plasma en estudio interpolando los tiempos en la gráfica. La velocidad de reacción esta determinada por la concentración del fibrinógeno <sup>(41)</sup>.



## 4.2. MÉTODOS CROMOGÉNICOS

Las técnicas de sustratos sintéticos hacen posible medir la actividad de procoagulantes individuales y proteínas reguladoras, evitando así las técnicas complicadas de múltiples pasos e interferencias por medios coagulométricos, para medir proteínas individuales <sup>(42)</sup>.

Los métodos de sustratos sintéticos incluyen pocas variables, pocas fuentes de error y menos especulación en la identificación de un analito, con sensibilidad y especificidad de técnicas de química clínica <sup>(42)</sup>.

Los métodos cromogénicos son métodos funcionales, estos se diferencian de los coagulométricos porque la reacción se mide fotométricamente al liberarse un compuesto colorido, esta reacción puede ser de punto final o cinética <sup>(41)</sup>.

Los cromógenos son péptidos unidos a una molécula de para-nitro-anilina, son sustratos sintéticos que, dependiendo de la secuencia peptídica (contienen la estructura primaria de la molécula del sustrato original), directamente unida a la molécula de para-nitro-anilina muestran diferente afinidad a las enzimas plasmáticas en estudio. Dicha enzima hidroliza la unión peptídica entre el aminoácido y la molécula de p-N-anilina liberado esta última. La molécula de p-N-anilina tiene un par electrónico libre que por el fenómeno de resonancia genera color con una absorbancia máxima de 405 nm <sup>(41)</sup>. La reacción se interrumpe en medio ácido. La velocidad de reacción obedece a una cinética de primer orden (depende de la concentración de uno de los reactantes) y de la temperatura que deberá ser constante a 37 °C. La prueba puede realizarse en forma manual, que se conoce con

el nombre de técnica de dos puntos, en donde a un tiempo transcurrido se interrumpe la reacción agregando un ácido. Los métodos automatizados o semiautomatizados superan en ventaja a esta prueba eliminando la necesidad de controlar el tiempo y la temperatura que son las principales causas de error. También permite economizar porque requiere un menor volumen de muestra y de reactivos. Los lectores de los cromógenos realizan varias lecturas determinando la velocidad de la reacción, por lo que a este método se le conoce como método cinético <sup>(42)</sup>.

El uso de sustratos sintéticos en análisis de enzimas, comenzó con la observación de Sherry, Troll y Wachman (1954) donde proteínas coagulantes y fibrinolíticas eran capaces de hidrolizar ésteres de arginina, dichas proteínas llamadas serínproteasas, parecidas a la tripsina, capaces de hidrolizar enlaces peptídicos. Los sustratos peptídicos sensibles a una hidrólisis enzimática específica fueron sintetizados evitando las dificultades para obtenerlos en su forma natural y en estado puro. La primera generación, fueron compuestos simples de ésteres de amino ácidos ( por ejemplo: tosil-arginina-metil ester o bensoil-arginina-etil éster) los cuales poseían una capacidad limitada <sup>(42)</sup>.

Colman fue el primero en reportar aplicaciones clínicas de este nuevo principio a los problemas clínicos, aplicándolas a determinaciones del sistema de calicreína humana, basado en un proyecto bioquímico, valuable en investigar alteraciones de estos componentes en carcinomas, pancreatitis, bacteriemia, enfermedades hepáticas, terapia de estrógenos y estados alérgicos <sup>(42)</sup>.

El trabajo de Blomback y sus colaboradores ayudaron a entender la estructura molecular de las serín proteasas y sus sustratos, activadores e inhibidores. Los aminoácidos en sus posiciones 1,2 y 9 del fibrinopéptido A (FPA) (Fen-Val-Arg) eran homólogos en varias especies. Posteriormente, la síntesis y evaluación de éste oligopéptido reveló que poseía actividad anticoagulante y afinidad por la trombina. Esto orientó a asumir que la secuencia representaba el sitio activo para la trombina en la molécula del fibrinógeno <sup>(42)</sup>.

Subsecuentemente, Svendsen y colaboradores, introdujeron la segunda generación de sustratos sintéticos en 1972. Estos contenían un tripéptido, secuencia Fen-Val-Arg unido al cromóforo para nitro anilina; (Bz-Fen-Val-Arg-pNa), Dicho sustrato cromogénico provee una medida directa y simple de la actividad de la enzima. Subsecuentemente otros investigadores usaron la secuencia del sitio de hidrólisis de otros sustratos naturales para producir equivalentes sintéticos. También se desarrollaron sustratos usando fluoróforos marcados <sup>(42)</sup>.

En teoría, los sustratos cromogénicos tienen una amplia aplicación en pruebas de hemostasia, evitando muchos errores de las técnicas antiguas de coagulación, pero se deben considerar varias desventajas, primero un sustrato sintético es menos específico para una enzima que uno natural, los sustratos naturales son polipéptidos de aproximadamente de 60,000 daltons de peso molecular con estructuras secundaria y terciaria específicas, en cambio los sustratos sintéticos son simples cadenas largas de tripéptidos, por lo que estos métodos son cuantitativos pero no cualitativos para la actividad de la enzima y también pueden ocurrir reacciones no específicas en la misma reacción. Se puede aumentar la especificidad del método al

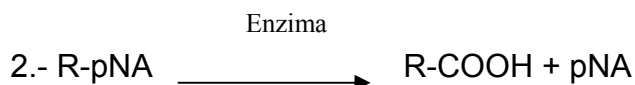
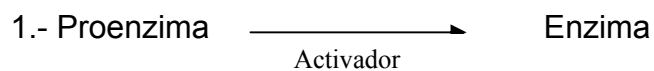
corregir dichas reacciones no específicas adicionando inhibidores o corriendo controles específicos <sup>(42)</sup>.

Segundo, los sustratos sintéticos no reconocen el mismo grado de funcionalidad de la enzima como lo hacen los naturales. Como ejemplo tenemos, los factores dependientes de vitamina K que durante la terapia con anticoagulantes orales una parte de los mismos aparecen descarboxilados, dichos factores no son funcionalmente activos en la coagulación sin embargo son medidos por sustratos sintéticos <sup>(42)</sup>.

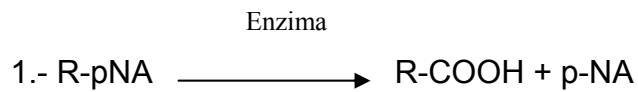
La tercera generación de sustratos cromogénicos son los compuestos de pseudoaminoácidos, un pseudoaminoácido es un amino ácido sintéticamente modificado, como ciclohexilglicina, ciclohexiltroxina, cicloexilalanina y norleucina.

Los sustratos cromógenos siguen siendo por su facilidad y bajo costo, utilizados en determinaciones de hemostasia con reacciones bioquímicas bien definidas. Los esquemas generalizados para cuantificación de parámetros hemostáticos utilizando los sustratos cromogénicos se ilustran en las siguientes reacciones enzimáticas <sup>(42)</sup>.

Determinación de **proenzima** (método indirecto): mide una proenzima o nivel de actividad de un activador generando la enzima: <sup>(42)</sup>



Determinación de la **Enzima** (método directo) cuantifica directamente la actividad de la enzima:

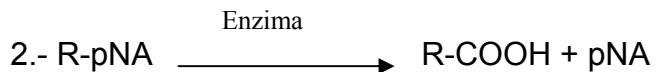
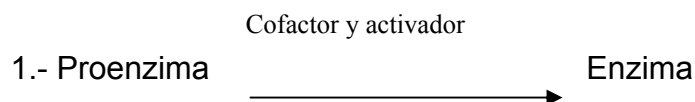


Determinación del **Inhibidor**: cuantifica el nivel de actividad de la enzima de un inhibidor endógeno contra una enzima purificada adicionado exógenamente:

1.- Enzima pura + inhibidor  $\longrightarrow$  complejo (Enzima-inhibidor + enzima residual)



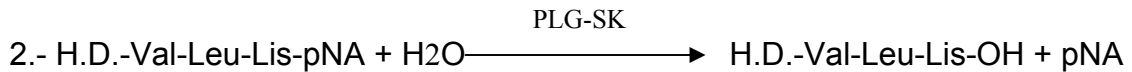
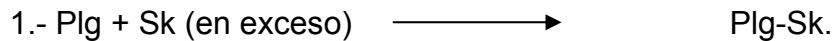
Determinación de **cofactor**: cuantifica el nivel de actividad de un cofactor normalmente presente para aumentar la cantidad de reacción enzimática: <sup>(53)</sup>



Las aplicaciones específicas de los sustratos cromogénicos para determinar los componentes del sistema fibrinolítico son las siguientes:

#### 4.2.a. Determinación de plasminógeno (funcional)

La actividad funcional plasmática del plasminógeno (Plg), puede ser determinada por un método amidolítico o con un método caseinolítico. El método amidolítico es el método cromogénico. Este método se basa en que al plasma en estudio convenientemente diluido, se le agrega un exceso de estreptoquinasa (Sk). El complejo Plg-SK formado, cataliza la ruptura del sustrato y se libera p-NA. Como la Sk se añade en exceso, no hay plasminógeno libre que pueda ser activado a plasmina. En estas condiciones, la actividad enzimática del complejo Plg-SK no es afectada por los inhibidores plasmáticos.



La velocidad de liberación de pNA se mide fotométricamente a 405 nm, utilizando un registrador (método de velocidad inicial) o haciendo la lectura luego de frenar la reacción con ácido acético (método de punto final). La concentración de plasminógeno se calcula, a partir de una curva estándar, preparada a partir de diluciones del plasma normal de sustratos<sup>(40)</sup>.

#### 4.2.b. Determinación del Activador Tisular del Plasminógeno ( t-PA )

En la fibrina hay ciertas estructuras plipeptídicas de alta afinidad por t-PA y Plg. (sitios específicos). En presencia de fibrina, t-PA y Plg se adhieren a la misma y reaccionan entre sí, a una velocidad 1.000 veces mayor que en presencia de fibrinógeno. Las estructuras de alta afinidad se encuentran también en productos de degradación del fibrinógeno por BrCN y en la Poli-D-Lisina, por lo cual pueden usarse como estimuladores de la reacción, igual que la fibrina soluble. El sustrato cromogénico S2251 en estas condiciones, es específico para plasmina. El principio del método consisten en la mezcla de Plg-Glu puro, t-PA, fibrina soluble (o variantes) y S2251. (R.Giuliani y E. Szwarczer)<sup>(40)</sup>.

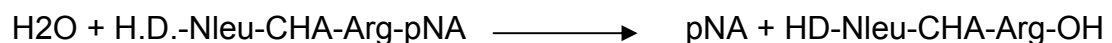
#### 4.2.c. Determinación de $\alpha_2$ -antiplasmina ( APL)

Método amidolítico. El ensayo consta de 2 pasos:

1.- El plasma en estudio se agrega a una cantidad de plasmina medida y en exceso:



2.- La plasmina residual libera , a partir del sustrato cromogénico, pNA:



La velocidad de liberación de pNA se mide fotométricamente a 405 nm.<sup>(40)</sup>

#### **4.2.d. Determinación del Inhibidor del Activador Tisular del Plasminógeno (PAI)**

Se trata de un método en dos etapas, basado en la técnica descrita por Chmielecka y colaboradores.

En la primera etapa se expone una concentración fija de t-PA (estándar), a la acción del inhibidor PAI durante un tiempo fijo (20 min). En la segunda etapa, previa inhibición de la  $\alpha_2$ -antiplasmina por acidificación de la muestra, se mide el t-PA residual, sobre una mezcla de sustrato + plasminógeno + estimulador (poli-D-lisina o fibrina).

Se requiere un sustrato cromogénico específico para plasmina (por eso debe ser inhibida la  $\alpha_2$ -antiplasmina), puede usarse tanto el S2251 como el propuesto por Biopool (D-But-CHT-Lis-pNA) el cual es algo más veloz en el desarrollo del color <sup>(40)</sup>.

#### **4.2.e. Determinación en 3 etapas de PAI por método cromogénico**

1. El plasma del paciente se diluye con el plasma deficitario de PAI, pero que contiene todos los inhibidores de la fibrinólisis, los cuales son mantenidos en un nivel constante durante todo el ensayo.
2. El plasma diluido se incuba con una cantidad medida de t-PA purificado.





3. En presencia de fibrina, poli-D-lisina, etc y de un exceso de plasminógeno, se determina el t-PA residual, midiendo la cantidad de plasmina que se genera. La plasmina generada se mide espectrofotométricamente utilizando p-NA como sustrato cromogénico. La curva de referencia se realiza con plasmas calibrados con t-PA, provistos por el equipo comercial y no con una mezcla de plasmas normales <sup>(40)</sup>

### 4.3. MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS

Los métodos Inmunoenzimáticos son utilizados para medir la concentración de las proteínas en rangos de nanogramos o picogramos por mililitro, como se muestra en la tabla 9, por lo que la sensibilidad del inmunoensayo es mayor que la sensibilidad de los métodos que utilizan sustrato sintéticos y técnicas coagulantes, los cuales miden en rangos de miligramos y microgramos por mililitro <sup>(42)</sup>.

Técnica	Límite de Detección
Coagulantes	$10^{-6}$ g/mL
Sustratos sintéticos	$10^{-6}$ g/mL
Inmunológicas: Aglutinación de Latex	$10^{-6}$ g/mL
Nefelométrica	$10^{-6}$ g/mL
Inmunodifusión Radial	$10^{-6}$ g/mL
Electro inmunodifusión	$10^{-6}$ g/mL
Radio inmunodifusión	$10^{-12}$ g/mL
Inmunoenzimática	$10^{-12}$ g/mL
Fluoroimmunoenzimática	$10^{-12}$ g/mL

Tabla 9. Sensibilidad de varias técnicas usadas para evaluar parámetros hemostáticos <sup>(42)</sup>.

Todos los inmunoensayos se basan en reacciones de antígeno-anticuerpo, en las cuales la sustancia que se analiza es el antígeno, el analito, y el reactante es el

anticuerpo o inmunoglobulina. Miden las características antigénicas de las proteínas sin importar la utilidad de la misma.

Se emplean con mucha frecuencia para determinar la concentración plasmática de antígenos y de haptenos.

Actualmente se han desarrollado pruebas inmunológicas en hemostasis, se han producido anticuerpos policlonales contra las proteínas hemostáticas en animales de laboratorio y anticuerpos monoclonales en cultivo. A los anticuerpos se une covalentemente un marcador o ligando el cual puede ser detectado y medido. Se utilizan como marcadores ligando radioactivos tales como  $H_3$  y  $I_{125}$ ; enzimas como peroxidasa o fosfatasa alcalina entre otros. Las enzimas reaccionan con un sustrato produciendo un color que puede ser medido así como la reactividad o fluorescencia producidos por los otros reactantes <sup>(42)</sup>.

Los inmunoensayos no son aplicables a cambios cualitativos, cambios estructurales en el sitio de unión antígeno-anticuerpo se ven afectados, tendrían poca sensibilidad, en cambio aberraciones hereditarias en la molécula que no afectan dicha unión, son cuantificados sin problema, por lo que proteínas disfuncionales serían detectadas en concentraciones normales. Cambios que afecten su carga, en determinaciones con movilidad electroforética la concentración se ve afectada seriamente <sup>(42)</sup>.

Recientemente se han desarrollado marcadores moleculares, que son fragmentos de proteínas hemostáticas (oligopéptidos) o sustancias de bajo peso molecular (< 10,000 daltons) encontrados en concentraciones de nanogramos o

picogramos por mililitro en la sangre y que se generan como productos de hidrólisis o liberados por las células en caminos específicos de activación e inicio de problemas hemostáticos <sup>(42)</sup>.

En términos generales los métodos inmunoenzimáticos se dividen en métodos competitivos en fase homogénea o heterogénea que pueden emplearse para cuantificar moléculas pequeñas, pero que tienen menor sensibilidad y especificidad que los métodos no competitivos en fase homogénea o heterogénea como la técnica de ELISA <sup>(42)</sup>.

Los métodos inmunoenzimáticos se clasifican de acuerdo al método de detección en:

- a. Aglutinación
- b. Nefelométricos
- c. Inmunodifusión radial (IDR)
- d. Electroinmunodifusión
- e. Radio inmunoensayo (RIA)
- f. Inmunoensayo enzimático (EIA)
- g. Fluoroinmunoensayo (FIA)

#### **4.3.a. Aglutinación**

Existen dos tipos de aglutinación: el método inmunológico y el no inmunológico. En el método inmunológico utiliza partículas de microlátex cubiertas con el anticuerpo monoclonal contra la proteína en estudio que en presencia del

antígeno se formará una red de aglutinación. Esta reacción puede titularse para hacer un método semicuantitativo. Este método se utiliza para determinar Dímeros D-D y productos de digestión del sistema fibrinógeno-fibrina.

El método no inmunológico es la técnica de ristocetina. Se utilizan plaquetas humanas rígidas (con formaldehído), se agrega ristocetina plasma problema, la ristocetina actúa como cofactor del Von Willebrand que se une a la glucoproteína I-b de la membrana de la plaqueta, aglutinándolas.

#### **4.3.a.1. Determinación de Dímeros D-D**

Es una técnica rápida semicuantitativa, para determinar productos de digestión de la fibrina. Dímeros D-D en plasma son indicativos de coagulación activa (figura 28). Se utilizan partículas de látex, recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti D-D humanas. La prueba es positiva con valores superiores a 0.5 µg/ml.

Es una prueba menos sensible que la determinación de Dímeros D-D por inmunoenzimática, pero es una prueba útil por ser rápida en un diagnóstico de emergencia (por ejemplo CID) o en control de terapia trombolítica. En CID los valores son sumamente aumentados. El ensayo no es sensible a la presencia de fibrinógeno, a los productos de digestión tempranos (fragmentos X y Y ), y al fragmento E, <sup>(40)</sup>.

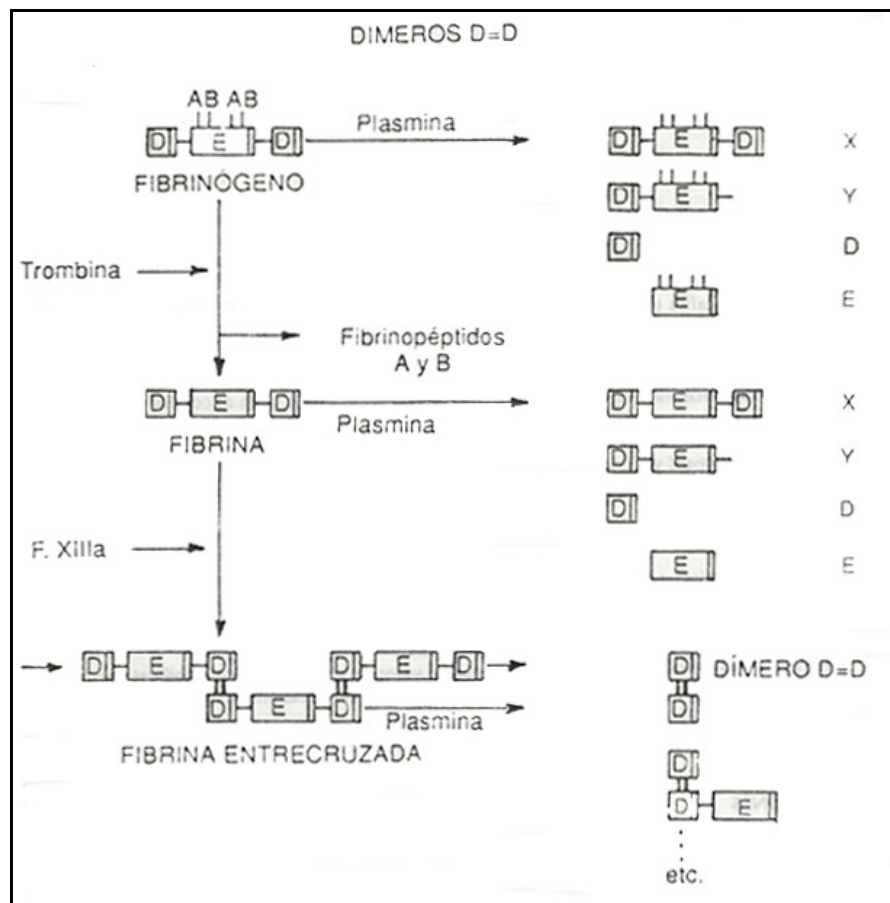


Figura 28. Formación de Dímeros D-D <sup>(40)</sup>

#### 4.3.a.2. Determinación de Productos de Digestión de Fibrinógeno/Fibrina (PDF/pdf)

Estos métodos fueron desarrollados a principios de los años 1970, tanto en suero como en orina. Valores elevados de PDF/f se encuentran en embolia pulmonar, infarto al miocardio y DIC.

Como estos fragmentos se derivan de fibrinógeno y fibrina, niveles elevados no pueden ser directamente correlacionados a coagulación activa. Resultados falsos positivos en suero y en orina, se encuentran en presencia de factor reumatoide. Las

muestras de plasma son consideradas la muestra fisiológica, el suero elimina la reactividad cruzada del fibrinógeno <sup>(42)</sup>.

### **1.- Método de Aglutinación de partículas de látex-antifibrina**

Los productos de digestión del fibrinógeno y/o fibrina, que puedan existir en suero aglutinan las partículas de látex que tienen adheridos el anticuerpo antifibrina, al producirse la reacción antígeno-anticuerpo. Se realiza la reacción en una serie de diluciones del paciente, plasmas normales y controles en solución fisiológica y se agrega el reactivo de látex-antifibrina <sup>(40, 44)</sup>.

### **2.- Método de Aglutinación de los estafilococos**

La aglutinación de estafilococos (SCT), cuya técnica original es de Hawiger, constituye, junto con la de Merskey, las pruebas más sensibles para la detección PDF/f. Las bacterias se pueden adquirir en el mercado o pueden ser preparadas a partir de la cepa de estafilococos aureus Newman D2C coagulasa negativa. Esta cepa tiene un factor de aglutinación (coagulasa), que hace que las bacterias se aglutinen cuando hay fibrinógeno, productos tempranos de digestión del fibrinógeno y/o fibrina (X, Y) o cuando hay monómeros de fibrina provenientes de la ruptura de complejos solubles. Esta prueba no es sensible a productos de digestión tardíos (D, E).

Inmediatamente de tomada la muestra de sangre, se coloca en un tubo con trombina y un inhibidor fibrinolítico (trasylol), se incuba y se separa el suero. Se pesa el liofilizado de bacterias y se diluye en tampón imidazol, se diluye el suero, el

estandar de fibrinógeno y se le añade la dilución de estafilococos, se agita y observa la aglutinación en fondo oscuro.

Los resultados son expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de equivalente de fibrinógeno. La estimación de PDF/f ( $\mu\text{g/mL}$ ) = sensibilidad del reactivo por inversa de la dilución. La sensibilidad del reactivo es fibrinógeno estándar sobre la inversa del título aglutinante dado en  $\mu\text{g/mL}^{(40)}$ .

### **3.- Inhibición de la aglutinación de eritrocitos tanados**

Cuando un suero anti-fibrinógeno es añadido a eritrocitos tanados, sensibilizados con fibrinógeno, los anticuerpos se unirán al fibrinógeno en la membrana de los eritrocitos y, consecuentemente, éstos se aglutinarán. Los productos de digestión del fibrinógeno y/o fibrina tienen una afinidad similar para el anticuerpo y si están presentes, se producirá un fenómeno competitivo por el fibrinógeno. Por lo que esta prueba detecta la cantidad de productos de digestión, por el grado de inhibición de la aglutinación de los eritrocitos.

#### **4.3.b. Nefelometría**

Estas técnicas fueron primeramente reportadas por Libby en 1938, para medir la reacción de la toxina y antitoxina diftérica <sup>(160)</sup>; Schultze y Schwick en 1959, utilizaron un cambio en la densidad de la luz dispersada del rayo original para cuantificar la formación de complejos anfígeno-anticuerpo. En soluciones diluidas, la reacción de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo incrementa la reflexión que

se puede medir por la dispersión de una luz incidente. Los nefelómetros originales median la intensidad de la luz dispersada en un ángulo de  $90^\circ$  de la luz incidente. Para aumentar la sensibilidad, se realizaron modificaciones como medir solamente el rayo de luz reflejado a  $70^\circ$ , así como el incorporar dispositivos electrónicos cerca del aparato de detección, para minimizar el ruido producido por el polvo y otros contaminantes, (figura 29), <sup>(42)</sup>.

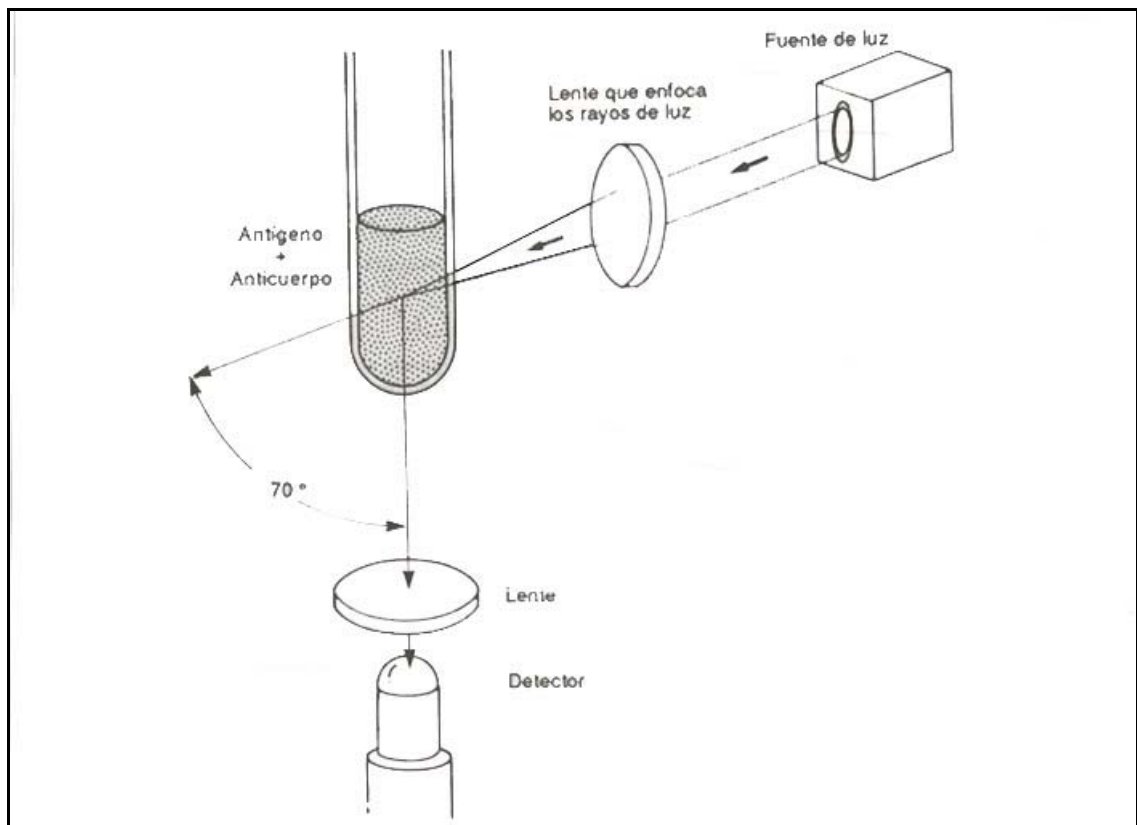


Figura 29. Principio de la nefelometría para medir las reacciones antígeno-anticuerpo. Los rayos de luz de un láser u otra fuentes luminosa de alta intensidad, se colocan en el lente de enfoque y pasan a través del tubo de ensayo que contiene el antígeno y el anticuerpo. Al pasar la luz a través del tubo y salir en un ángulo de  $70^\circ$ , se colecta mediante otro lente y se enfoca en un detector electrónico. Esta señal se convierte en un registro digital que mide la cantidad de turbidez en el tubo de ensayo, y se puede relacionar matemáticamente con la concentración de antígeno-anticuerpo en la muestra <sup>(160)</sup>.



El uso de buffer polimérico intensificaba la luz al aumentar la insolubilidad del complejo antígeno-anticuerpo. La aplicación del rayo láser que utilizan como fuente de luz el helio y neón, desarrolló un sistema de mayor sensibilidad con la luz monocromática de alta intensidad en una sola dirección en un solo rayo. La inmunodifusión automatizada emplea un nefelómetro fluorométrico en línea, con una serie de canales de paso de flujo que permiten la medición simultánea de varias muestras al mismo tiempo. También se han utilizado para las mediciones de dispersión de luz un analizador centrífugo rápido modificado, equipado con una fuente de rayo láser. Este método tiene las ventajas de potenciales de velocidad, requerimiento de pequeñas cantidades de reactivos y versatilidad para otros análisis.

De este modo un rayo de luz monocromática puede atravesar una suspensión de partículas de microlátex de diámetro muy pequeño. En esta técnica se recubren las partículas de microlátex con anticuerpos específicos que en presencia del antígeno se aglutinan formando conglomerados de mayor diámetro que absorben la luz. De esta manera se relaciona la densidad óptica con la concentración de antígeno presente en la muestra <sup>(160)</sup>.

Los inmunoensayos son realizados al adicionar cantidades constantes de antisuero específico muy purificado y con claridad óptica, a diversas cantidades de antígeno. Se mide la reacción bajo un rayo de luz y el grado de dispersión se mide en una celda fotoeléctrica como densidad óptica. La medición precisa de los antígenos solo se puede hacer en la rama ascendente de la curva de precipitación (Figura 30), donde existe una relación lineal directa entre las concentraciones de antígeno y la

densidad óptica. Así para una concentración precisa de las soluciones con altas concentraciones de antígeno, se diluyen las muestras a diversas concentraciones <sup>(42)</sup>.

Las desventajas de la técnica son un costo relativamente alto de antisueros de alta respuesta y con claridad óptica de especificaciones uniformes, así como los instrumentos.

Se encuentran muchas aplicaciones para el área de coagulación, los inmunoensayos son realizados por análisis de punto final el cual requiere de 1 a 2 hrs de incubación o por análisis cinéticos los cuales se miden inmediatamente. Se encuentran pruebas disponibles para Factor VIII:Ag, proteína C, protrombina, ATIII,  $\alpha_1$ antitripsina,  $\alpha_2$ macroglobulina, C1-INH, Plasminógeno, Fibrinógeno, fibronectina, FDPs y anafilotoxinas <sup>(42)</sup>.

#### **4.3.b.1. Determinación de Productos de Digestión de Fibrinógeno/Fibrina (PDF/pdf) por Nefelometría Láser**

La especificidad del método depende de la especificidad del antisuero utilizado. El único inconveniente del método es el costo del nefelómetro láser.

Se obtiene el suero al recoger 5 ml de sangre con 0,1 mL de trombina bovina, 0.1 mL de tromboplastina y 0.1 mL sol de épsilon aminocaproico al 25 %. Se incuba a 37 °C durante 2 hrs y se centrifuga para obtener el suero.

Se utiliza antisuero antifibrinógeno para nefelometría. Se utilizan muestras de suero sin diluir y diluidas y se mezclan con 200  $\mu$ L de antisuero antifibrinógeno diluido 1:7 en una cubeta y se incuban 60 min a temperatura ambiente. Se lee la

turbidez en nefelómetro, restando a cada valor los bancos correspondientes a lectura de cubeta vacía, y dilución del suero con solución salina 0.15 M. Los valores obtenidos son convertidos a  $\mu\text{g}$  de antígeno relacionado a fibrinógeno, mediante la curva de calibración <sup>(40)</sup>.

#### **4.3.c. Inmunodifusión**

Las técnicas de inmunodifusión tienen como propósito detectar la reacción antígeno-anticuerpo, mediante la reacción de precipitación. La formación de dichos complejos en medio semisólido como agar, depende de los electrolitos del amortiguador, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo <sup>(160)</sup>.

La precipitación máxima se forma en el área de equivalencia, con disminución de su cantidad en las zonas de exceso de antígeno o exceso de anticuerpo <sup>(160)</sup>.

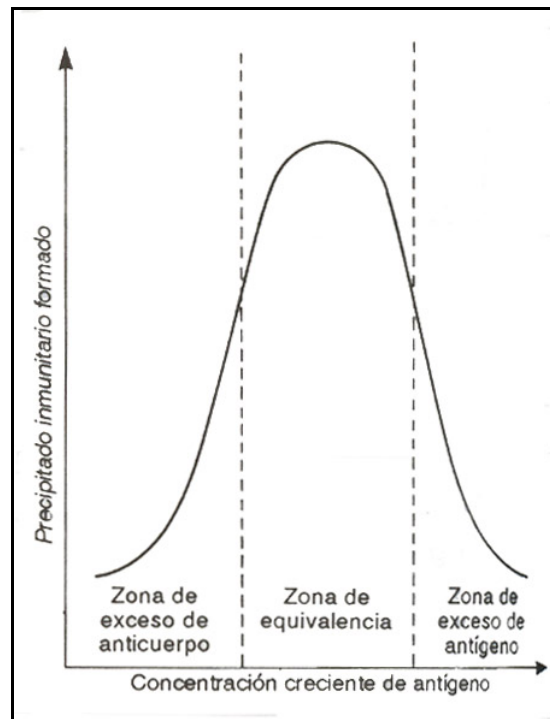


Figura 30. Curva de precipitación antígeno-anticuerpo  
 Curva típica de precipitación que resulta de la titulación del antígeno en concentración creciente, graficado en comparación con la cantidad de precipitado que se forma; la cantidad de anticuerpo se mantiene constante todo el tiempo (160).

En 1946, Oudin describió un sistema de difusión sencilla de antígeno y anticuerpo en tubos llenos de agar. A este importante avance, pronto siguió la descripción clásica de Ouchterlony y de la doble fusión en agar colocado sobre placas de vidrio. Este método todavía tiene aplicación en detección y análisis de sistemas de precipitación antígeno-anticuerpo (160).

Las reacciones de inmunodifusión se pueden clasificar como sencillas o dobles. En la inmunodifusión sencilla, el antígeno o el anticuerpo permanecen fijos y el otro reactante se desplaza y se une con él. En la doble, ambos reactantes se

pueden mover uno hacia el otro y precipitar. El movimiento, en cada tipo de inmunodifusión, puede ser lineal o radial <sup>(160)</sup>.

La inmunodifusión tiene aplicación clínica en el análisis cuantitativo y cualitativo de las proteínas, aunque en la actualidad existen métodos más sensibles y automatizados como nefelometría, ELISA o RIA <sup>(40,160)</sup>.

#### **4.3.c.1. Inmunodifusión radial**

Originalmente descrita en 1948 por Ouchterlony, sostenía que la concentración de un antígeno es directamente proporcional a la cantidad de precipitado producido como resultado de su difusión en una preparación de agarosa que contenía el antisuero correspondiente <sup>(42)</sup>.

La común metodología de la inmunodifusión radial esta basada en la técnica de Manzini, en la cual una muestra en estudio es introducida en el gel de agarosa que difunde radialmente del pozo <sup>(93)</sup>. El área del precipitado alcanza un tamaño máximo, el cuadrado del diámetro del anillo es linealmente proporcional a la concentración del antígeno. Esta técnica es reproducible pero tiene la desventaja del consumo de tiempo, requiere 48 horas para obtener resultados. Se encuentran comercialmente disponibles reactivos para determinar ATIII, plasminógeno,  $\alpha_1$ antitripsina,  $\alpha_2$  macroglobulina,  $\alpha_2$ AP y fibrinógeno <sup>(42)</sup>.

#### **4.3.c.1.a. Determinación de Plasminógeno**

Se realiza en un soporte de agarosa al 1 % en tampón, incorporando el antisuero antiplasminógeno a la agarosa, el antisuero con un título de 3 U/mL en proporción de 1 %. Con esta agarosa que contiene el antisuero se hace un gel de 2 mm de espesor sobre una placa de vidrio. Se siembran 5  $\mu$ L del plasma del paciente y del plasma control en pozos de 3 mm de diámetro. Se hace el corrimiento electroforético refrigerado, aproximadamente 10° C de 3 a 4 hrs a 2 mA/cm.

En el comercio se pueden adquirir las placas que contienen el antisuero específico incorporado a la agarosa. La misma técnica se utiliza para determinar  $\alpha$ 2 antiplasmina incorporando el antisuero correspondiente con un título de 1.5 U/mL (40).

#### **4.3.d. Inmunoelectroforesis**

La inmunoelectroforesis combina la separación electroforética, difusión y precipitación inmunitaria de las proteínas, con lo cual se puede obtener la identificación y cuantificación aproximada de proteínas individuales presentes en suero, plasma, orina y otros líquidos biológicos (160).

Inicialmente fue descrito por Grabar y Williams en 1953 esta técnica ha seguido hasta la actualidad siendo una poderosa herramienta de trabajo en química analítica (42).

Aplicando un campo eléctrico es posible separar a las proteínas plasmáticas en un gel de agarosa, dependiendo sobre todo de su tamaño y de su carga

electrostática, si se agrega al gel de agarosa un anticuerpo dirigido contra la proteína de la que se desea conocer su concentración, está precipita en el gel, el frente de migración del precipitado se relaciona directamente con la cantidad de proteína presente en la muestra <sup>(160)</sup>.

Las aplicaciones clínicas de la electroinmunodifusión son la electroinmunodifusión doble unidimensional (contrainmunolectroforesis) y electroinmunodifusión simple unidimensional ( electroforesis de rocket de Laurel).

La primera conocida también como inmunolectroforesis a contracorriente, contrainmunolectroforesis y electroprecipitación, tiene su principio básico en la electroforesis simultánea de antígeno y anticuerpo en direcciones opuestas, de pozos separados en el gel, con la precipitación resultante en un punto intermedio entre sus orígenes. Las desventajas principales de la doble difusión sin fuerza electromotriz son el tiempo que se requiere para la precipitación (24 horas) y la falta relativa de sensibilidad. Esta técnica solo es semicuantitativa <sup>(42, 160)</sup>.

En la técnica de Laurell, denominada de cohete (rocket), electroinmunodifusión simple unidimensional, el antígeno migra bajo la corriente de un campo eléctrico a través de un medio que contiene un anticuerpo, formando patrones de precipitado en forma de cohete. La cuantificación del antígeno, es proporcional a lo largo del cohete. Esta técnica puede ser realizada en un tiempo de 1 a 2 horas <sup>(42)</sup>.

Dicho patrón ocurre porque la precipitación se presenta a lo largo de los márgenes laterales de los bordes de antígeno en movimiento, al desplazarse el antígeno en el agar que contiene el anticuerpo, gradualmente se pierde antígeno por precipitación, su concentración en el borde anterior disminuye y los márgenes

laterales convergen para formar un punto agudo. La distancia total de la migración del antígeno es linealmente proporcional a la concentración del antígeno. La sensibilidad de esta técnica es de cerca de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para proteínas.

Se puede determinar Plasminógeno en agarosa de electroendósmosis media al 1 % en tampón, un antisuero antiplasminógeno de 3 U/ml se agrega al gel en proporción de 1 % y se prepara el gel de 2 mm de espesor en una placa de vidrio. Se siembran 5  $\mu\text{L}$  del plasma del paciente y controles en pozos de 3 mm de diámetro y se realiza la migración.

Se puede utilizar la técnica de Laurell modificada, utilizando un soporte de celulosa gelificado o placas de Titán III en lugar de la agarosa. Con estos soportes se utiliza menos cantidad de antisuero y el tiempo de corrimiento es menor. Con esta técnica también se determina APL <sup>(42)</sup>.

#### **4.3.d.1. Electro inmunodifusión sobre acetato de celulosa en capa delgada**

Utiliza un soporte de Titán III, placas de 76 X 60 mm. Se utilizan 20  $\mu\text{L}$  de antisuero antiplasminógeno con un título aproximado de 3 U/mL disuelto en 3 mL de tampón, ajustando a un pH de 8.8. Se sumergen las placas de agarosa en el tampón durante un tiempo determinado, se secan entre dos papeles filtro y se colocan en una cubeta de electroforesis equilibrada con tampón. Se colocan 4  $\mu\text{L}$  de las diluciones del plasma previamente coloreadas con azul de bromofenol seco, en el borde inferior del catódico, dejando 5 mm entre siembras. Se barre la placa con la dilución del antisuero, sin tocar la zona de siembra, hasta que se absorba totalmente en el gel.



Se colocan puentes de papel filtro en los extremos catódicos y anódicos, se lleva a cabo el corrimiento 120 min. a 180 Volts a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan las placas durante toda la noche en cloruro de sodio 0.9 %, se colorean durante 30 min. con azul de bromofenol al 1 % en etanol, se decoloran con metanol-acético-agua y se fijan en formaldehído al 40 % 1 min. Se sumergen en glicina 7 % durante 3 min. y secan al aire. Se mide la altura de los picos obtenidos, usando papel bilogarítmico, se grafican en las abscisas el nivel de plasminógeno y en las ordenadas la altura de los picos correspondientes. El nivel de plasminógeno de la muestra se deduce con la recta de calibración obtenida.

Este método también utilizado para determinación de APL con los cambios correspondientes del fabricante <sup>(40)</sup>.

**4.3.d.2. La inmunoelectroforesis bidimensional (IEB)**, primero descrita por Ressler en 1960 posee más especificidad en la identificación y caracterización de los antígenos. En la práctica, se realiza la electroforesis en el primer paso en la formación del cohete y en un segundo paso se rota el agar 90 grados, el agar contiene el complejo antígeno-anticuerpo y se realiza un segundo corrimiento electroforético <sup>(42)</sup>.

Con este método no se pueden medir combinación de antígeno-anticuerpo.

#### **4.3.d.2.a. Determinación de Plasminógeno**

##### **1. Agarosa**

Se realiza la electroforesis en la primera dimensión, en agarosa al 1 % en tampón, cerca del extremo inferior catódico, sembrar 8  $\mu$ L del plasma citratado en un hoyo de 4 mm. Correr durante 2 hrs a 5 mA/cm en ambiente refrigerado.

Para correr la segunda dirección incorporar agarosa que contenga 1.5 % de antisuero antiplasminógeno y correr 3 a 4 hrs a 3 mA/cm. Continuar el ensayo como la técnica de Laurell <sup>(40)</sup>.

##### **2. En Acetato de Celulosa en capa delgada**

Se utiliza la técnica de plasminógeno por acetato de celulosa, Se corta la corrida, se rota la placa 90° y se barre la mismas con antisuero, hasta que éste se absorba totalmente en el gel, se efectúa la corrida electroforética durante 120 min. a 180 V, a temperatura ambiente. Se continúa la técnica de acetato de celulosa en capa delgada.

Para determinar APL, se utilizan los mismos materiales de acetato de celulosa excepto el antisuero y se corre e interpreta igualmente.

También se puede realizar con plasminógeno en la primera dimensión en donde antes de el primer corrimiento, se esparce una dilución de plasminógeno sobre uno de los bordes de la placa desde el extremo anódico hasta el catódico hasta que se absorba totalmente en el gel y luego se procede a sembrar la muestra sobre el extremo inferior catódico <sup>(40)</sup>.

#### 4.3.e. Radio Inmunoanálisis (RIA)

Yalow y Berson en 1959 fueron los primeros en reportar el uso de RIA, se basa en la unión competitiva del antígeno radiomarcado y otro no marcado a un anticuerpo monoespecífico <sup>(42)</sup>.

La concentración de antígeno marcado libre, no unido, es cuantificado y relacionado a la concentración de antígeno no marcado a través del uso de estándares. La cantidad de proteína marcada unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la proteína en estudio no marcada unida al anticuerpo <sup>(42)</sup>. El método de medición es la cuenta radiactiva, método que depende del tipo de radiación emitida por la marca, se utiliza un contador líquido de centelleo para emisor alfa, beta o gama . Estos datos procesados por un sistema computarizado, la respuesta se interpola en una curva patrón <sup>(42)</sup>.

El método de radio inmunoanálisis es la técnica disponible más sensible para estudios en hemostasis, solo que requiere equipo y manejo especiales para material radioisotópico <sup>(42)</sup>.

Los métodos incluyen determinación de FPA, péptidos B $\beta$  15-42 , ATIII, prostaglandinas, complemento C3 y C5 asociados con DIC, complejos ( $\alpha_2$  AP-plasmina, plasmina- $\alpha_2$  M ) y plasminógeno <sup>(42)</sup>.

#### **4.3.f. Inmunoensayo enzimático**

La técnica de (EIA) es similar a RIA excepto que el radionucleótido es remplazado por una enzima. El paso inmunológico final es por lo tanto seguido de la reacción indicadora que permite revelar la actividad de la enzima en el complejo antígeno-anticuerpo y es determinado fotométricamente. Las enzimas utilizadas como marcadores unidas al anticuerpo pueden ser peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa galactosidasa, malato deshidrogenasa o glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (42).

Las ventajas de EIA sobre RIA, los reactivos tienen mayor vida media, no son estrictamente regulados por manejo de isótopos y son menos caros.

Los métodos EIA son homogéneos y heterogéneos. Los homogéneos se desarrollan compitiendo por uniones entre el antígeno marcado con la enzima y el antígeno buscado, no marcado, por un número fijo de sitios de unión del anticuerpo, fig 31. El principio de la cuantificación se basa en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima por el complejo antígeno-anticuerpo. Como en este método no se requiere una separación de los reactantes, este sistema se conoce como método homogéneo. Esto permite un fácil manejo de automatización aunque también puede tener interferencias por los componentes del plasma (42).

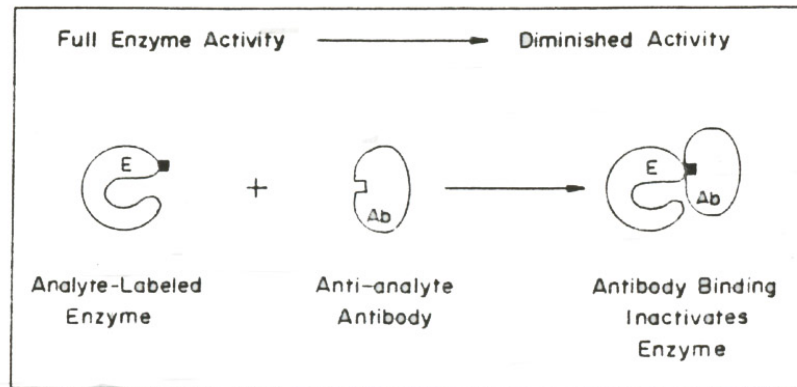


Figura 31. Diagrama de un inmunoensayo enzimático Homogéneo. El complejo antígeno-(analito-enzima) anticuerpo (antianalito) reduce la actividad de la enzima. Por unión competitiva de la enzima marcada y el analito no marcado por el anticuerpo, es posible cuantificar el analito <sup>(42)</sup>.

El principio del sistema heterogéneo, conocido también como ELISA (valoración inmunoabsorbente ligada a enzimas). Requiere que el reactante libre sea separado del reactante unido a la fase sólida después de cada reacción ya que la enzima conjugada al antígeno mantiene su actividad tanto cuando esta libre como conjugada. La técnica de separación es usualmente una simple aspiración. Sin embargo algunos procedimientos requieren centrifugación, sedimentación, doble anticuerpo o separación por perlas de vidrio. El principio del método de ELISA se basa en un sistema de unión competitivo o no competitivo usando una enzima ligada al antígeno o a un anticuerpo <sup>(42)</sup>.

El método competitivo ELISA se realiza en varios pasos, primero una incubación, donde hay una competencia entre el antígeno del plasma y el antígeno marcado con la enzima para un limitado número de moléculas de anticuerpo que previamente cubren la superficie de un contenedor de plástico (un soporte sólido,

como las placas de poliestireno o de policloruro de vinilo con pozos). En un segundo paso, se incuba el sustrato específico para la enzima marcada. Se produce un producto colorido que es liberado por la hidrólisis enzimática, la absorbancia del producto es inversamente proporcional al complejo enzima-antígeno unido a la pared del contenedor de plástico. Por lo que al incrementar la concentración de antígeno plasmático resulta en menor intensidad de color de la reacción <sup>(42)</sup>.

El cociente entre la cantidad de anticuerpo unido al antígeno plasmático y el anticuerpo unido al antígeno marcado es usado para calcular la concentración relativa del antígeno plasmático.

El método no competitivo o técnica de sándwich tiene su principio en que a veces emplea en su medición de antígenos relativamente largos que poseen varias determinantes antigénicas. El primer paso requiere anticuerpo que va a recubrir la superficie del soporte plástico. Segundo, se adiciona el antígeno plasmático, el cual se une al anticuerpo anteriormente añadido. Tercero, se adicionan anticuerpos marcados con la enzima, produciéndose un complejo de sándwich de antígeno unido en dos lados por el anticuerpo, enseguida se adiciona el sustrato y el cromógeno y se determina fotométricamente la cantidad de anticuerpo unido a la enzima unido al soporte. El aumento de la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del antígeno, ver figura 32 <sup>(42)</sup>.

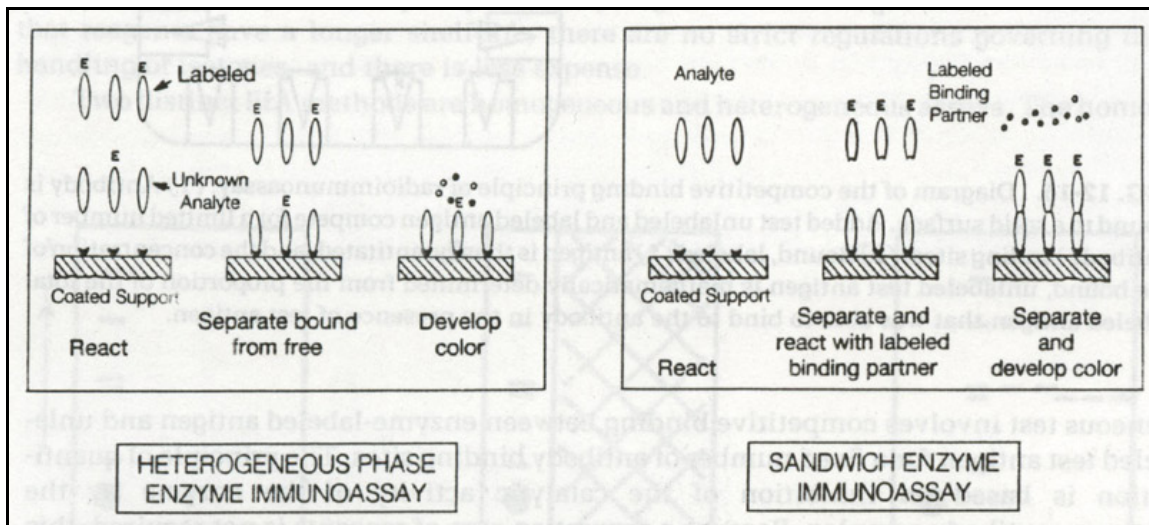


Figura 32. Comparación de la fase heterogénea competitiva y el inmuno ensayo de sándwich: El método heterogéneo utiliza la unión competitiva del antígeno marcado y no marcado para un anticuerpo fijado en la fase sólida., el método de sándwich utiliza un segundo anticuerpo marcado para unirse a los sitios antigénicos libres del complejo antígeno-anticuerpo. Ambos utilizan una reacción enzimática con el anticuerpo marcado en un segundo paso de cuantificación <sup>(42)</sup>.

Se pueden determinar por estas técnicas de ELISA: PF4.,  $\beta$ TG,FPA, dímero D-D, factores VIII:Ag, X; IX y VII. plaquetas unidas a anticuerpo, péptidos B $\beta$ 15-42. <sup>(42)</sup>

#### 4.3.f.1. Activador tisular del plasminógeno (t-PA)

El inmunoensayo (ELISA) permite la cuantificación de t-PA en plasma, extractos celulares, sobrenadantes de cultivos. Es una técnica muy útil para determinar bajos niveles de proteínas, con una buena sensibilidad (el límite de detección es menor de 0.1 mg/ml) y con una alta especificidad.

Una microcubeta de plástico se recubre con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-t-PA humano. La muestra que contiene el t-PA a medir se pone en contacto con el anticuerpo, por lo tanto, el t-PA de la muestra se une al soporte de plástico a través de un epítope. Se agrega a continuación el anticuerpo monoclonal anti-t-PA conjugado con peroxidasa, que se une a los epítopes de t-PA libres restantes.

Se revela la actividad enzimática de la peroxidasa unida, usando como substrato ortofenilendiamina, en presencia de peróxido de hidrógeno.

Se deben consultar los detalles técnicos en las instrucciones del equipo comercial, así como sus valores normales y establecer los rangos de normalidad debido a la variabilidad <sup>(40)</sup>.

#### **4.3.f.2. Determinación de Dímeros D-D**

Este método ELISA es un procedimiento que permite su determinación cuantitativa en plasma o suero. Es una prueba muy específica y sensible (límite de detección menor de 0.5 ng/mL).

Se recubre una cubeta de plástico con un anticuerpo monoclonal anti D-D humano específico, la muestra se pone en contacto con el antisuero, si contiene productos de degradación D-D, se une al soporte plástico a través de un determinante antigénico. A continuación se agrega un anticuerpo monoclonal de conejo anti D-D humano, conjugado con peroxidasa, que se une a los determinantes antigénicos de D-D libres restantes. Se revela la actividad enzimática de la



peroxidasa unida, usando como sustrato orto-fenilendiamina, en presencia de peróxido de hidrógeno. El rango normal está por debajo de 400 ng/mL.

La detección de Dímeros D como es muy sensible permite detectar estados protrombóticos iniciales, ayuda a realizar diagnósticos diferenciales, control, tratamientos antitrombóticos, etc. También se encuentra aumentado en estados de activación sanguínea con fibrinólisis: metástasis de pulmón, tumores de ovario <sup>(40)</sup>

#### **4.3.f.3. Complejos de Inhibición Serín-proteasas**

Los complejos de serín proteasas activadas con su respectivo inhibidor como plasmina- $\alpha_2$ -AP, Plasmina- $\alpha_2$ M entre otros de los cuales se han desarrollado anticuerpos monoclonales aplicables a las técnicas de ELISA <sup>(40)</sup>.

#### **4.3.g. Fluoroimmunoensayo ( FIA)**

Emplea el mismo principio que el método de ELISA, con la excepción que el fluoróforo (derivado fluoresceínado ) es usado en lugar de un cromóforo-enzima, con esto se puede aumentar la sensibilidad de la reacción.

Se han desarrollado técnicas en dipsticks, los reactivos están contenidos en un stick sobre el cual se lleva a cabo la reacción y es leída en un lector fluorómetro especial. Para esta técnica existen determinaciones de  $\alpha_1$  AT,  $\alpha_2$  M y anafilotoxinas C3, C4 y C5. <sup>(42)</sup>

El sistema automatizado se utiliza una tableta que contiene el anticuerpo inmovilizado al cual se une el antígeno, se adiciona el antígeno marcado el cual se une al anticuerpo en los sitios que no se unió la muestra del paciente. Se adiciona

un substrato que reacciona con el antígeno marcado para producir fluorescencia. Este sistema es capaz de realizar reacciones no competitivas como la descrita y competitivas, en la cual la muestra y el antígeno marcado se adicionan simultáneamente. <sup>(42)</sup>

## **4.4. DIVERSOS**

### **4.4.a. Lisis del coágulo**

#### **4.4.a.1. Tiempo de Lisis del Coágulo de sangre entera diluída**

La dilución de la sangre entera, en la cual se mantiene la proporción normal de los componentes del sistema fibrinolítico, facilita la acción de los activadores fibrinolíticos y acorta el tiempo de lisis de los coágulos formados por acción de la trombina.

La sangre mezclada con trombina diluída en solución fisiológica y tampón se llevan a un baño de 37 °C y se registra el tiempo, se observa periódicamente hasta la lisis total del coágulo. Los valores normales son  $\geq 18$  horas, en estados hiperfibrinolíticos el coágulo puede lisarse antes de 2 hrs. <sup>(40)</sup>

#### **4.4.a.2. Tiempo de Lisis de euglobulinas**

Las euglobulinas son un grupo de proteínas plasmáticas que se precipitan en medio ácido, ellas son el fibrinógeno, la plasmina, el plasminógeno y sus activadores quedando en solución la mayor parte de los inhibidores. El precipitado de euglobulinas es disuelto, con preferencia en medio alcalino y luego es coagulado. El tiempo de lisis de este coágulo es inversamente proporcional a la actividad

fibrinolítica plasmática. Un tiempo acortado indica presencia de plasmina o aumento de activadores ( u otras enzimas proteolíticas) <sup>(40, 44)</sup>.

#### **4.4.b. Pruebas de paracoagulación**

La determinación de complejos solubles de monómeros de fibrina se cuenta con dos pruebas genéricas:

- a) Prueba de Etanol
- b) Prueba de Sulfato de Protamina, con diluciones seriadas.

En estas técnicas el agregado de diversos reactivos (etanol, sulfato de protamina) modifican las condiciones de solubilidad de estos complejos, que por ello se agregan o precipitan, permitiendo su visualización. Lo mismo ocurre con el agregado de hematíes que tienen adsorbidos en su superficie monómeros de fibrina. <sup>(40)</sup>

Estas técnicas tienen la ventaja de su metodología simple, requiriendo, no obstante, una ejecución cuidados y una interpretación adecuada, ya que son afectadas por variaciones de fuerza iónica, pH, temperatura, etc., conduciendo a veces a resultados positivos o negativos, por lo que el resultado aislado no tiene ningún valor.

La presencia de productos de digestión de un plasma prueban que hay actividad fibrinolítica (figura 33), pero no autorizan a juzgar sobre su carácter primario o secundario. En cambio, la presencia de monómeros de fibrina sugieren que hay o ha habido actividad trombínica.

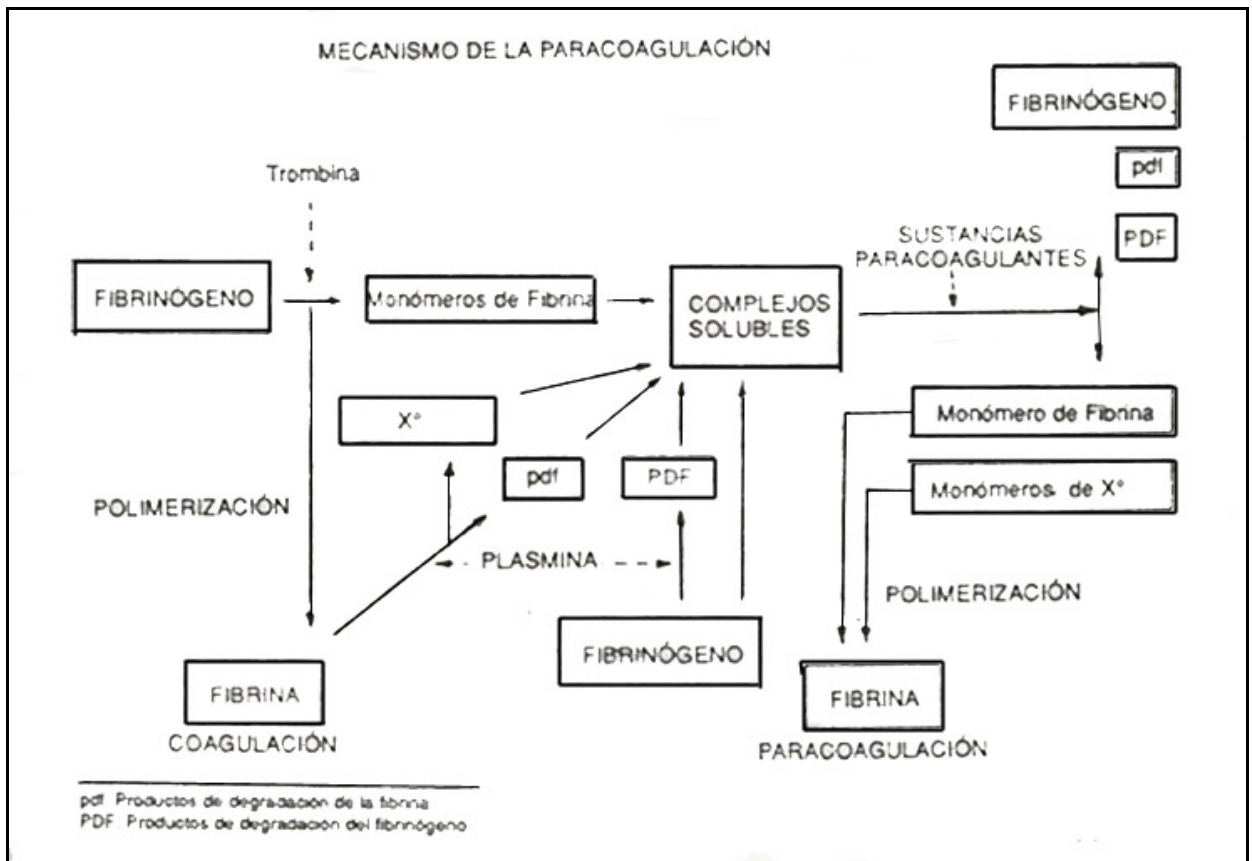


Figura 33. Mecanismo de la Paracoagulación

#### 4.4.b.1. Prueba del etanol

Esta técnica fue descrita primero por Godal y Abilgaard en 1966 y posteriormente modificada por Breen y Tullis. <sup>(40)</sup>

#### Método de Godal y Abilgaard

Requiere sangre citratada a la que se ha agregado trasylol, se obtiene plasma pobre en plaquetas, el plasma es incubado y se le agrega etanol al 50 % , después

de un tiempo de reposo se lee el resultado. La presencia de un gel indica el resultado positivo. Se leen por cruces, gel +++ , fibras gruesas ++ y fibras finas + .

Se debe realizar esta prueba antes de 2 hrs de extraída la muestra. Es muy sensible a las variaciones del fibrinógeno, niveles altos mayor positividad, niveles bajos hasta pruebas negativas. También se positivas con una proteína anómala de bajo peso molecular (60 000) presente en algunas patologías y que precipita con etanol en presencia de fibrinógeno.

Es una prueba muy sensible a la presencia de complejos solubles, correspondientes a monómeros de fibrina (hasta 8 mg %), en cambio complejos formados con productos tempranos de la lisis de fibrina, el umbral de detección es de 200 mg % <sup>(40, 44)</sup>.

#### **Método de Breen y Tullis.**

Esta prueba introduce la variante, en observar un tubo a temperatura ambiente y otro a 37 ° C <sup>(40)</sup>.

#### **4.4.b.2. Prueba de Sulfato de Protamina**

Fué propuesta por primera vez por Lipinsky, para medir complejos solubles, utilizando densidad óptica o midiendo el volumen del precipitado de sangre entera. Posteriormente, fue descrita la formación no enzimática de fibrina (Paracoagulación), señalándose la especificidad de la técnica para detectar mónomes de fibrina y pdf tempranos.

### **Método de Gurewich y Hutchinson**

Utiliza una muestra de sangre citratada en relación 9/1 v/v, se añade aprotinina y se espera un precipitado a temperatura ambiente, la muestra debe efectuarse dentro de 2 hrs de tomada la muestra.

Esta prueba es más sensible que la prueba de etanol, ya que se positiviza en presencia de solo 2 mg % de monómeros de fibrina o de fdp, es más específica porque es menos influenciada por las altas concentraciones de fibrinógeno o de proteína anómala <sup>(40)</sup>.

Productos comerciales. Para la detección rápida y cualitativa de complejos solubles en plasma por la técnica de hemaglutinación.

#### **4.4.c. Método de placas de fibrina**

(Determinación de la actividad fibrinolítica)

Método descrito para estudios de fibrinólisis. Permite estudiar en forma semicuantitativa, la presencia de plasmina, activadores del plasminógeno e inhibidores de los activadores.

Consiste en colocar el material a estudiar, que puede ser plasma, euglobulinas, orina, LCR, etc., sobre una superficie de coágulo de fibrina, que recubre el fondo de una placa de petri y medir el área de digestión de la fibrina, luego de la incubación.

Este método se realiza en 2 etapas: la primera se agrega una cantidad fija del activador a un plasma pobre en plaquetas para inducir la inhibición, en una segunda etapa la actividad residual del activador se calcula comparando las áreas de lisis que

producen en una placa de fibrina la muestra del paciente y distintas diluciones de un activador de concentración conocida. La cantidad de activador residual, luego de su inhibición es inversamente proporcional a la concentración del mismo <sup>(40, 44)</sup>.

#### **4.4.c.1. Determinación del Inhibidor del Activador Tisular del Plasminógeno (PAI)**

En la primera etapa del método, se agrega una cantidad fija del t-PA a un plasma pobre en plaquetas, para inducir la inhibición por parte del PAI, por lo que el t-PA agregado al plasma debe estar en exceso con respecto del inhibidor. Luego la muestra es acidificada, para inhibir la  $\alpha_2$ -antiplasmina y evitar que interfiera con el t-PA residual.

En la segunda etapa, la actividad del t-PA residual se calcula comparando las áreas de lisis, que producen en una placa de fibrina la muestra del paciente y distintas diluciones de un t-PA de concentración conocida. La cantidad de t-PA residual, luego de su inhibición por el PAI, es inversamente proporcional a la concentración del PAI.

El nivel del PAI plasmático es muy variable, la concentración plasmática normal en individuos en ayunas y sin hipertrigliceridemia se ha estimado en 5.5 UI/mL +/- 5 UI/mL. Lo más frecuente es hallar valores que oscilan entre 8 y 56 UI/mL. Hay variaciones diurnas importantes, siendo los niveles matinales casi el doble que los nocturnos <sup>(40)</sup>.

#### 4.4.d. Ensayo funcional por adsorción

Este método también es utilizado para el sistema fibrinolítico.

Utiliza placas de cloruro de polivinilo en las cuales es adsorbido un activador e inhibido después, el inhibidor se cuantifica fotométricamente con un sustrato cromogénico.

Este método se fundamenta en la selectiva capacidad de inhibición que el PAI, contenido en las muestras, ejerce sobre la uroquinasa de dos cadenas, previamente adsorbida a una placa de cloruro de vinilo (PVC) <sup>(40)</sup>.

En una placa de microtitulación se realiza la adsorción de uPA de dos cadenas con una solución de 12.5 UI/mL. Luego de incubar la placa durante 4 hrs a temperatura ambiente, se lava con solución de lavado y a continuación se procede al bloqueo durante 1 hr, a temperatura ambiente. Se lava nuevamente 3 veces y se depositan sobre la placa las muestras a estudiar incubándose 1 hr a 37° C, después de transcurrido el tiempo, se realiza el lavado de los pocillos y se confecciona en la misma placa y sobre pocillos no adsorbidos una curva de u-PA en tampón de reacción, la cual será empleada para la titulación de la muestra. Finalmente es añadida la mezcla de reacción e incubada la placa en estufa de 37° C con atmósfera humidificada hasta lograr en los puntos máximos de la curva de titulación absorbancias de 0.9 a 1.1 (aproximadamente 8 hrs) <sup>(40)</sup>.



#### 4.4. Técnicas Histoquímicas

Las muestras de tumor obtenidas son almacenadas en nitrógeno líquido hasta la extracción, primero son pulverizados utilizando un micro dismembrador (B Braun Biotech International, Melsunge, Germany), y son extraídos con Cytosol y Triton S-100, posteriormente son centrifugados obteniendo el sobrenadante (citolo) para su estudio, la determinación de las proteínas es de acuerdo a los métodos utilizados <sup>(142,143)</sup>.

Ensayos inmunoenimáticos (ELISA) de alta sensibilidad se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo American Diagnóstica, Greenwich, C:T: USA; -biopool, Umea, Sweden; Technoclone, Viena, Austria; Byk-Sangtec, Dreieich, Germany; Inmuno, Heidelberg, Germany; Oncogene Science, Boston, USA; Inmundiagnostik, Heidelberg Germany) para determinar u-PA, u-PAR, PAI-1 y PAI-2 en tejidos de cáncer de mama. Existen seis diferentes formatos para determinar uPA por ELISA, han sido evaluados y comparados por miembros del Grupo de Estudio de Biomarcadores y Receptores del EORTC ( Organización Europea de Búsqueda y Tratamiento del Cáncer) en conjunto con BIOMED-1 en el consorcio con Clínica Relevance de Proteasas en la Invasión del Tumor y Metástasis <sup>(10,52)</sup>.

En los Kits ELISA de las diferentes compañías, los anticuerpos y estándares se incluyen con altas correlaciones fueron obtenidos de extractos de tejido de cáncer de mama <sup>(106)</sup>. PAI 1/2 y u-PAR ELISA también fueron sujetos a control de calidad por dicho grupo (resultados no publicados).

Métodos cuantitativos con transcripción reversa PCR han sido también desarrollados para la cuantificación de proteasas. Los fragmentos genéticos son amplificados en el sistema Light Cycler real time PCR utilizando primers y SYBR Green I de Roche Diagnostics <sup>(106, 143)</sup>.

Análisis por la técnica de Northern Blot también ha n sido empleadas para determinar mRNA niveles de u-PA, u-PAR y PAI-1 en cáncer de esófago <sup>(111)</sup>.

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

- Con base en los datos existentes de múltiples investigaciones, se ha confirmado el significado clínico de los factores proteolíticos en el desarrollo e invasión del cáncer.
- A estos nuevos factores proteolíticos, se les ha dado la categoría de fuertes e independientes factores pronósticos en muchos tipos de cánceres.
- Los factores proteolíticos pueden ayudar a clasificar a los pacientes con buen o mal pronóstico de recaída y supervivencia libre de la enfermedad mejor que los histomorfológicos hasta ahora utilizados.
- Estos factores biológicos son lo suficientemente sensibles para ayudar a identificar mejor a los pacientes y designarles estrategias de tratamiento individual
- La determinación de estos factores proteolíticos en tejido fresco de su tumor primario, nos indican el riesgo de desarrollar metástasis al encontrar niveles altos.

- En cáncer de mama en particular, las proteasas u-PA, u-PAR, PAI-1 y PAI-2 han sido clasificados como fuertes e independientes factores pronósticos.
- u-PA y PAI-1 pueden ser considerados como elementos de uso de rutina en el pronóstico de pacientes con nuevo diagnóstico de cáncer de mama.
- Pueden ayudarnos a identificar pacientes con nódulos axilares negativos con alto riesgo de sufrir metástasis, a los cuales se les administra terapia coadyuvante sistémica para prevenir su recaída.
- Mientras que los pacientes de bajo riesgo, que pueden sobrevivir con el tratamiento local o quirúrgico, se les puede reducir el riesgo de sobretratamiento a dicha terapia
- El PAI-2 también es considerado un buen marcador pronóstico, cuyos niveles elevados indican buen pronóstico de supervivencia libre de la enfermedad aún con niveles altos de u-PA .
- El u-PAR se ha relacionado a pobre pronóstico, pocos estudios han confirmado su valor pronóstico independiente; siempre se relaciona a u-PA.
- Muchos medicamentos utilizados en el tratamiento de pacientes con cáncer son capaces de producir alteraciones del sistema fibrinolítico, esto sumado a la predisposición que tienen estos pacientes de sufrir alteraciones trombóticas, hemorrágicas y estados subclínicos fibrinolíticos hacen más riesgosa su supervivencia, por lo que se recomienda vigilar a éstos pacientes

para evitar complicaciones por hemorragias antes de someterlos a quimioterapias, terapias antimicrobianas, transfusiones y cirugías.

- Las pruebas que sirven como marcadores de activación subclínica de la fibrinólisis incluyen:
  - los antígenos de u-PA, t-PA
  - determinación de complejos plasmina- $\alpha_2$ antiplasmina por métodos inmunológicos, que permiten la cuantificación de bajos niveles con alta especificidad.
  
- Las pruebas que demuestran una fibrinólisis sistémica se pueden medir por técnicas de rutina como son:
  - lisis de coágulo en sangre total,
  - lisis de coágulo de euglobulinas,
  - lisis de placas de fibrina para activadores y plasmina.
  
- Los PDF/f y Dímeros D-D nos demuestran una fibrinólisis secundaria.
  
- La determinación de sustratos en líquidos de drenaje para demostrar la activación fibrinolítica localizada, también se recomiendan técnicas inmunológicas.

## ABREVIATURAS

$\alpha_2$ APL	alfa 2 antiplasmina
$\alpha_2$ M	alfa 2 macroglobulina
$\alpha_2$ MR	receptor de alfa 2 macroglobulina
ATIII	antitrombina III
BFGF	factor de crecimiento de fibroblastos beta
CID	coagulación intravascular diseminada
ECM	matriz extracelular
EGF	factor de crecimiento epitelial
ERK	extracelular signal regulated kinase
FAK	cinasa de adhesión focal
Fn	fibronectina
FPA	fibrinopéptido A
FPB	fibrinopéptido B
GFD	dominio factor de crecimiento
gp <sub>330</sub>	glucoproteína epitelial 330
GPCR	proteína-G- acoplada a receptor
GPI	glucofosfatidilinositol
HRG	glucoproteína rica en histidina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
JAK	cinasa Janus
JNKs	N terminal cinasas

KD	kilo daltons
LBS	sitios de unión a la lisina
LRP	receptor de lipoproteína de baja densidad relacionada a proteína
MAPK	protein cinasas con actividad mitógena
MMPs	metaloproteinasas
OvSerpinas	Inhibidores serínproteasas pertenecientes a las ovoalbúminas
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PAI-2	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2
PAI-3	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3
PCI	inhibidor de la proteína C o PAI-3
PDF/f	productos de digestión del fibrinógeno/ fibrina
Plg	plasminógeno
Pln	plasma
pro-uPA	proenzima de u-PA
RAP	receptor asociado a proteína
Ras	proteína unida al nucleótido de guanina
RGD	péptido Arg-Gly-Asp
RTKs	receptor de tirosin cinasas
SAPKs	stress activated protein kinases
SCCA-1	antígeno de células de carcinoma escamoso tipo 1
SERPINS	inhibidores serín proteasas o serpinas
Shc	proteínas adaptadoras
Sk	estreptoquinasa
STAT	transductores de señal y activadores de transducción

suPAR	receptor soluble para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa
TAFI	inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina
TNF	factor de necrosis tumoral
t-PA	activador tisular del plasminógeno
TP	Tiempo de Protrombina
TT	Tiempo de Trombina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activada
u-PA	activador del plasminógeno tipo uroquinasa
u-PAR	receptor para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
Vn	Vitronectina



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tulinsky A. The Structure domains of blood proteins. *Thromb. Haem.* 1991;66:16-31.
- 2.- Anglés-Cano E., Mecanismos Bioquímicos de la fibrinólisis fisiológica. *Biol. Clin. Hematol.* 1992; 14:57-62.
- 3.- Anglés-Cano E. Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids.* 1994; 67/68:353-62.
- 4.- Binder B.R. Physiology and Pathophysiology of the Fibrinolytic system. *Fibrinolysis.* 1995; Supl.1:3-8.
- 5.- Angles-Cano E, Hervio L, Rouy D, Fournier C, Chapman J M, Laplaud M, Koschinsky. Effects of lipoprotein (a) on the binding of plasminogen to fibrin and its activation by fibrin-bound tissue-type plasminogen activator. *Chemistry and Physics of Lipids.* 1994; 67/68:369-80.
- 6.- Vassalli J D. The urokinase receptor. *Fibrinolysis* 1994; 8:172-181.
- 7.- Blasi F, Conese M, Moller L B, Pedersen N, Cavallaro U, Cubellis M V, *et all.* The Urokinase Receptor: Structure, Regulation and Inhibitor mediated internalization. *Fibrinolysis* 1994; 8:182-8.
- 8.- Meijer M van, Pannekoek H. Structure of Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 1995; 9:263-76.
- 9.- Dear A E, Medcalf R L. The cellular and molecular biology of plasminogen activator inhibitor type-2. *Fibrinolysis* 1995; 9:321-30.
- 10.- Dano K, Behrendt N, Brunner N, Ellis V, Ploug M, Pyke C. The urokinase protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis* 994; 8:189-203.
- 11.- Ellis V, Wun T C, Behrendt N, Renne E and Dano K. Inhibition of receptor-bound urokinase by plasmin-activate inhibitors. *J. Biol Chem.* 1990; 265:9904-8.
- 12.- Dear A E and Medcalf R L, Plasminogen activator inhibitor type-2, PAI-2 (CD87) is a pleiotropic molecule. *European J of Biochemistry* 1988; 252:185-93.
- 13.- Kruithof E R, Baker M S and Bunn C L. Biological and clinical aspects of PAI-2. *Blood* 1995; 86:4007-24

- 14.- Dudley K, Strickland M , Kounnas Z and Scott Argraves W. LDL receptor related protein:a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. J Faseb 1995; 9:890-7.
- 15.- Ploug M. Structure funtion relationships in the interaction between the urokinase type plasminogen activator and its receptor. Curr Pharm Des. 2003; 9:1499-528.
- 16.- Gettins P, Patston P A, Schapira M. Structure and Mechanism of action of serpins. Hematol/Oncol clinics or North America 1992; 6:1393-1407.
- 17.- Mikus P, Urano T, Liljeström P and Ny T. Plasminogen-activator inhibitor type 2 (PAI-2) is a spontaneously polymerising SERPIN, Biochemical characterizacion of the recombinant intracelllular and extracellular forms. European J of biol chem 1993; 218:1071-82.
- 18.- Behrendt N, List K, Andreasen PA Dano K. The prourokinase plasminogen activation system in the presence of serpin type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal proenzyme activation. Biochem J 2003;15:277-87.
- 19.- Nyjaer A. Kjoller L, Cohen RL, Lwrence DA, Garni-Wagner BA *et all*. Regions involved in binding of urokinase type –1 inhibitor complex and pro-urokinase to the endocytic alpha –macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence that the urokinase receptor protects pro-urokinase against binding to the endocytic receptor. J Biol Chem 1994; 269:25668-76.
- 20.- Cahill MA, Janknecht R and Nordheim A. Signalling pathways: Jack of all cascades. Curr Biol 1996; 6:16-9.
- 21.- Winston LA and Hunter T. Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. Curr Biol 1996; 6:668-71.
- 22.- Leung S, Li X, Stark GR. STATs find that hanging together can be stimulating. Science 1996;273:750-1.
- 23.- Seger R and Krebs E. The MSPK signaling cascade. Faseb J 1995; 9:726-35.
- 24.- Vaial E,Sahai E, Marshall CK. ERK-MAPK signalling coordinately resultates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. Cáncer Cell 2003;4:67-79.
- 25.- Kjoller L and Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increases cell motility induced by urokinase type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. J Cell Biol 2001;152:1145-58.

- 26.- Clark EA and Brugge JS, Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-39.
- 27.- Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 1996;273:1551-5.
- 28.- Wei Y, Czekay RP, Robillard L, Kugler MC, Zhang F, Kim KK, *et al.* Resulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *JCB* 2005;168(3):501-11.
- 29.- Felding-Habermann B and Cheresh DA. Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5(5):864-8.
- 30.- Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:714-24.
- 31.- Chapman HA, Wei Y. Protease crosstalk with integrins: the urokinase receptor paradigm. *Throm Haemost* 2001;86:124-29.
- 32.- Ellis V, Bherendt N, Dano K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A Kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem* 1991;266:12752-8.
- 33.- Estreicher A, Mühlhauser J, Carpentier JL, Orci L and Vassalli JD. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarises expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme complexes. *J Cell Biol* 1990;111:783-92.
- 34.- Luzzato G and Schafer AI. The prethrombotic state in cancer. *Sem Oncol* 1990;17:147-59.
- 35.- Colman RW and Rubin RN. Disseminated intravascular coagulation due to malignancy. *Sem Oncol* 1990;17:172-86.
- 36.- Frederick SE and Scott H. Bleeding disorders in cancer. *Sem Oncol* 1990;17:187-97.
- 37.- Peter JR. Bleeding problems in the cancer patient. *Hematol Oncol Clin of NA* 1992;6:1315-1327.
- 38.- Gordon SG. Cancer cell procoagulants and their implications. *Hematol Oncol Clin of NA* 1992;6:1359-73.

- 39.- Eby Ch S. A review of the hypercoagulable state. *Hematol Oncol Clin of NA* 1993;7:1121-41.
- 40.- Grupo Clatht. *Manual de Hemostasis y Trombosis*. 2ª. Edición. Argentina: Editores Kordich L C, Sánchez JC y Vidal HO 1990.
- 41.- Martínez-Murillo C, Quintana-González S. *Manuel de Hemostasia y Trombosis*. 1ª Edición. México DF: Editorial Prado. 1996.
- 42.- Koepke, J.A. *Practical Laboratory Hematology*. Churchill Livingtone. USA. 1984.
- 43.- Rodak BF. *Diagnostic Hematology*. USA. WB Saunders Co. 1995.
- 44.- Hall R, Malia RG. *Medical laboratory haematology*. 1a Edition. London: Butterworths Co. 1986.
- 45.- Hoffbrand AV, Pettit JE. *Essential haematology*. Second Edition. Oxford London Edingurgh: Blackwell Scientific publications. 1984.
- 46.- Weiss GR. *Oncología clínica*. 1ª Edición. México DF: Editorial El manual moderno. 1997.
- 47.- Biggs R and Rizza CR. *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis*. Third edition. USA:Blackwell scientific publications. 1984.
- 48.- Hassouna HI. Laboratory evaluation of hemostatic disorders. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:1161-235.
- 49- Patterson WP. Coagulation in cancer: an overview. *Sem Oncol* 1990;17:140-6.
- 50.- Rosen PJ. Bleeding problems in the cancer patient. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:1315-28.
- 51.- Levine MN. Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy. *Throm Haemos* 1987;78:133-6.
- 52.- Minji Jo, Keena ST, Lihua W and Steven LG. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent efectos on cell signaling. *Biol Chem* 2003;278:46692-8.
- 53.- Ge Y, Elghetany MT. Urokinase plasminogen activator receptor (CD87): something old, something new. *Lab Hematol* 2003;9:67-71.

- 54.- Kher A, Hilgard P. Development and dissemination of malignant tumors and hemostasis. *Pathol Biol* 1982;30:861-7.
55. Korte W. Changes of the coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:679-92.
- 56.- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:42-51.
- 57.- Skrzydlewska E, Suldowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005;7:1251-66.
- 58.- Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rimer J. Plasminogen activation and cancer. *Throm haemost* 2005;93:676-81.
- 59.- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol.* 1998;13:893-906.
- 60.- Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Del Rosso A, Magnelli L, Chiarugi V. Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:193-207.
- 61.- Bass R, Ellis V. Cellular mechanisms regulating non-haemostatic plasmin generation. *Biochem Soc Trans* 2002;30:189-94.
- 62.- Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Can Metas Rev* 2003;22:205-22.
- 63.- Behrendt N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem* 2004;385:103-36.
- 64.- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:25-40.
- 65.- Magdolen V, Kruger A, Sato S, Nagel J, Sperl S, *et al.* Inhibition of the tumor-associated urokinase-type plasminogen activation system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in *in vitro* and *in vivo*. *Recent results Can Res* 2003;162:43-63.

- 66.- Jedinak A, Maliar T. Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Noeplasma* 2005;52:185-92.
- 67.- Kobayashi H. Mechanism of tumor cell-induced extracellular matrix degradation-inhibition of cell-surface proteolytic activity might have a therapeutic effect on tumor cell invasion and metastasis. *Nippon Sanka Fujinkkai Zasshi* 1996; 48:623-32.
- 68.- van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, van der Bent C, Drijfhout JW, *et al.* Urokinase-receptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer *in vivo*. *Am J Pathol* 2001;159:971-82.
- 69.- Romer J, Nielsen BS, Ploug M. The urokinase receptor as a potential target in cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2004;10:2359-76.
- 70.-Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 2003;160:781-91.
- 71.-Bell WR. The fibrinolytic System in neoplasia. *Semin Throm Hemost* 1996;22:459-78.
- 72.- Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualises managemen of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004;37:541-48.
- 73.- Reuning U, Magdolen V, Hapke S, Schmitt M. Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol chem* 2003;384:1119-31.
- 74.-Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K Kamikubo Y and Loskutoff DJ. The Low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 2004;279:22595-604.
- 75.-Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA and Farquhar MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related proteins is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* 2001;12:1467-79.
- 76.-Tarui T, Andronicos N, Czekay RP, Mazar AP, Bdeir K, Parry GC, *et al.* Critical role of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in urokinase(uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J Biol Chem* 2003;278:29863-72.

- 77.- Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004;39-49.
- 78.- Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;415:46-58.
- 79.- Engelse MA, Hanemaaijer R, Koolwijk R, van Hinsbergh VW. The fibrinolytic system and matrix metalloproteinases in angiogenesis and tumor progression. *Semin Throm Hemost* 2004;30:71-82.
- 80.- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Throm Hemost* 2004;30:5-20.
- 81.- Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 2003;10:541-4.
- 82.- Stepanova VV and Tkachuk VA. REVIEW: Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Protein bio msu* 2001;67:1-21.
- 83.-Kjoller L and Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increases cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J cell Biol* 2001;152:1145-57.
- 84.- Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997;15:398-408.
- 85.- Aguirre-Ghiso JA, Kovalski K and Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* 1999;147:89-104.
- 86.- Beeram M, Patnaik A and Rownsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6771-90.
- 87.- Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 2005;57:283-95.
- 88.- Seddighzadeh M, Zhou JN, Kronenwett U, Shoshan MC, Auer G, Sten-Linder M, Wiman B, Linder S. ERK signalling in metastatic human MDA-MB-231 breast carcinoma cells is adapted to obtain high urokinase expression and rapid cell proliferation. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:649-54.

- 89.- De Sousa LP, Brasil B, Silva BM, Freitas M, Nogueira SV, *et all*. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Bioch Biophys Res Com* 2005;329:237-45.
- 90.- Kyung HL, Eun Ych, myung SH and Jae-Ryong K. Involvement of MAPK pathway in hypoxia-induced up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor in a human prostatic cancer cell line, PC3MLN4. *Exp Mol Med* 2004;36:57-64.
- 91.- Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA. Effects of active MEK1 expression *in vivo*. *Can Lett* 2005;230:1-5.
- 92.- Schroeck F, Arroyo de Prada N, Sperl S, Schmitt M, Viktor M. Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn. *Biol Chem* 2002;383:1143-9.
- 93.-Medcalf RL and Stasinopoulos SJ. The undecided serpin. *FEBS J* 2005;272:4858-67.
- 94.- Al-Ejeh F, Croucher D and Ranson M. Kinetic analysis of plasminogen activator inhibitor type-2: urokinase complex formation and subsequent internalisation by carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 2004;297:259-71.
- 95.- Mazar AP. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Antican Drugs* 2001;12:387-400.
- 96.- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, ivansion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:25-40.
- 97.- Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M and Romer J. Plasminogen activation and cancer. *Throm Haemost* 20005;93:676-81.
- 98.- Merkel DE and Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1989;3:641-51.
- 99.-Tondini C, Hayes DF, Kufe DW. Circulating tumor markers in breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1989;3:653-73.
- 100.- Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:187-201.
- 101- Binz NM, Role of protein C inhibitor in breast cancer cell. *Biology honor thesis* 2003



- 102.- Cufer T. Clinical utility of serine proteases in breast cancer. *Radiol Oncol* 2004;38:85-92.
- 103.- Fox SB, Taylor M, Grondahl-Hansen J, Kakolyris S, Harris AL. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measured vascular remodelling in breast cancer. *J Pathol* 2001;195:236-43.
- 104.- Foekens JA, Buessecker F, Peters HA, Krainick U, Wim L, van Putten J, Loos MJ. Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:1423-7.
- 105.- van Roozendaal , Klijin JGM, Sieuwerts AM, Henzen-Logmans SC. Role of urokinase plasminogen activator in human breast cancer: active involvement of stromal fibroblasts. *Fibrinolysis* 1996;10:79-83.
- 106.- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, *et all*. Clinical Impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997;78:285-96.
- 107.- Li P, Gao Y, Ji Z, Zhng X, Xu Q, Li G, *et all*. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004;39:1512-9.
- 108.-Hundsdoerfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kok A, *et all*. Tumour-associated urokinase type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity-clinical relevance and prognostic value. *J Craniomaxillofac surg* 2005;33:191-6.
- 109.- Sierko E, Tokajuk P, Zimnoch L, Wojtukiewicz. The location or components of fibrinolytic system in laryngeal cancer. *Pol Merkuriusz Lek* 2003;15:81-5.
- 110.- Zhao EM, Han DM, Yu ZK, Fan EZ, Li Y. Expresión and significance of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitors in squamous cell carcinoma of human larynx. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003;38:39-42.
- 111.- Tang WH, Friess H, Kekis PB, Martingnoni ME, Fukuda A, Roggo A, Zimmerman A, Buchler MW. Serine proteinase activation in esophageal cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2249-58.

- 112.- Pedersen H, Grondahl-Hansen J, Francis D, Osterlind K, Hansen HH, Dano K, Brunner N. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1994;54:120-3.
- 113.- Harvey SR, Hurd TC, Makus G, Martinick MJ, Pennetrante RM, Tan D, *et all.* Evaluation of urinary plasminogen activator its receptor, matrix metalloproteinases 9 and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Res* 2003;9:4935-43.
- 114.- Sheng Q, Tang ZY, Xue Q, Shi DR. Invasion and metastasis or hepatocellular carcinoma in relation to urokinase type plasminogen activator its receptor and inhibitor. *J Can Res Clin Onc* 2000;126:641-6.
- 115.- Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, *et all.* Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Can Res* 1994;54:2900-7.
- 116.- Beyer BC, Heiss MM, Simon EH, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, *et all.* Urokinase system expression in gastric carcinoma. *Cancer* 2006;106:126-35.
- 117.- Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, *et all.* Porteases in gastrointestinal neoplastic diseases. *Clin Chem Acta* 2000;191:171-87.
- 118.- Gandolfo GM, Conti L, Vercillo M. Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 1996;16:2155-9.
- 119.- Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg* 2002;26:767-71.
- 120.- Shariat SF, Casella R, Monoski MA, Susler T, Gasser TC and Lerner SP. The addition of urinary urokinase type plasminogen activator to urinary nuclear matrix protein22 and cytology improves the detection of bladder cancer. *J Urol* 2003;170:2244-7.
- 121.- Shariat SF, Monoski MA, Andrews B, Wheeler TM, Lerner SP and Slawin KM. Association of plasma urokinase type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol* 2003;61:1053-8.
- 122.- Ho CH, Yuan CC, Liu SM. Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999;75:397-400.

- 123.- Schmalfeldt B, Kuhn W, Reuning U, Pache L, Dettmar P, Schmitt M, *et al.*  
Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of  
urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and  
2. *Can Res* 1995;55:3958-63.
- 124.- Konecny G, Untch M, Pihan A, Kimmig R, Gropp M, Stieber P. *et al.*  
Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with  
disease progression and prognosis in ovarian cancer.  
*Clin Cancer Res* 2001;7:1743-9.
- 125.- Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Fleuren GJ. Prognostic relevance of  
TGF-beta-1 and PAI-1 in cervical cancer. *Int J Cancer* 2004;112:1020-8.
- 126.- Miyake H, Hara I. Elevation of serum levels of urokinase-type plasminogen  
activator and its receptor its associated with disease progression and  
prognosis patients with prostate cancer. *Prostate* 2000;39:123-9.
- 127.- McCabe NP, Angwato FF, Zaher A, Selman SH, Kouinche A and Jankun J.  
Expression of soluble urokinase plasminogen activator receptor may be related  
to outcome in prostate cancer patients. *Oncol Reports* 2000;7:879-82.
- 128.- Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA. Hypomethylation of urokinase (uPA)  
promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic  
implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:471-8.
- 129.- Duffy MJ, O'Grady R, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ.  
Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas.  
Preliminary report. *Cancer* 1988;62:531-3.
- 130.- Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreassen P.  
Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in  
breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:6827-9.
- 131.- Janicke F, Schmitt M, Harfter R, Holirieder A, Babic r, Ulm K, Gössner W and  
Graeff H. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of  
early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 1990;4:69-78.
- 132.-FoekensJA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F and  
Dlijin JG. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671  
primary breast cancer patients. *Cancer Res* 1992;52(21):6101-5.
- 133.- Janicke F, Schmitt M Pache L, Ulm K, Hofler H and Graeff H. Urokinase (uPA)  
and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node  
negative breast cancer. *Breast Can Res Treat* 1993;24.195-208.

- 134.- Duffy MJ, Reilly D, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen PA. Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer* 1994;74:2276-80.
- 135.- Shiba E, Kim SJ, Taguchi T, Izukura M, Kobavashi T, *et al.* A prospective study on the prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator levels in breast cancer tissue. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123:555-9.
- 136.- Ozyilkan O, Baltali E, Ozdemir O, Tekuzman G, Kirazli S, Firat D. Haemostatic changes; plasma levels of alpha2-antiplasmin-plasmin complex and thrombin-antithrombin III complex in female breast cancer. *Tumori* 1998;84:364-7.
- 137.- Prechtl A, Harbeck N, Thomsen C, Meisner C, Untch M, *et al.* Tumor biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node negative breast cancer. *Int Biol Markers* 2000;15:73-8.
- 138.- McCarthy M. Two biomarkers for breast cancer relapse. *Lancet* 2000;355:9212-17.
- 139.- Sten-Linder M, Seddighzadeh M, Engel G, Rutqvist LE, Linder S, Skoog L, Wima B. Prognostic importance of the uPA/PAI-1 complex in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2861-5.
- 139'.- Harbeck N, Krugger A, Sinz S, Kates RE, Thomsen C, Schmitt M, Janicke F. Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1-a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie* 2001;24:238-44.
- 140.- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Dates R, *et al.* Pooled analysis of prognostic impact of urokinase type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:116-28.
- 141.- Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level I evidence studies. *Clin Chem* 2002;48:1194-7.
- 142.- Borstnar S, Vrhovec I, Svetic B, Tanja C. Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002;3:138-46.

- 143.- Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002;48:1288-95.
- 144.- Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical Relevance of prognostic factors in axillary node negative breast cancer. *Onkologie* 2003;26:438-45.
- 145.- Qin W, Zhu W, Wagner-Mann C, Folk W, Sauter ER. Association of uPA, PAI-1, and uPAR in nipple aspirate fluid (NAF) with breast cancer. *Cancer J* 2003;9:293-301.
- 146.- Harbeck N, Thomssen C. uPA (urinary plasminogen activator, urokinase) and its PA-I type 1 inhibitor are not only prognostically but also predictively significant and support clinical decision on therapy in primary carcinoma of the breast. *Zentralbl Gynakol* 2003;125:362-7.
- 147.- Schneeweiss A, Thomssen Ch, Harbeck N, Bastert G. Prognostic factors in carcinoma of the breast. Thereupon depends success of the treatment. *MMW Fortschr Med* 2003;145:34-8.
- 148.- Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Foekens JA, Beex LV, Sweep CG. Predictive impact of urokinase –type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type 1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:659-64.
- 149.- Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004;10:39-49.
- 150.- Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot a, van Tienove DT, Beex LV, Sweep FC. Complex of urokinase type plasminogen activator with its type a inhibitor predicts poor outcome in 576 patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 2004;101:486-94.
- 151.- Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Schmitt M *et al.* Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: an AORTC receptor and biomarker group collaboration. *Oncol Rep* 2005;14:235-9.
- 152.- Xiao JP, Yu XF, Xu XQ, Zhang L, He FR, Qi Y, Chen YH. Relation between angiogenesis, fibrinolysis and invasion/metastasis in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2005;27:226-8.

- 153.- Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, *et al.* Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor markers recommendations. *Tumor Biol* 2005;26:281-93.
- 154.- Decock J, Paridaens R, Cufer T. Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays?. *Curr Opin Oncol* 2005;17:545-50.
- 155.- Schmitt M, Sturmheit AS, Welk A, Schnelldorfer C, Harbeck N. Procedures for the quantitative determination of urokinase and its inhibitor, PAI-1 in human breast cancer tissue extracts by ELISA. *Methods Mol Mec* 2006;120:245-65.
- 156.- Weissentein U, Schneider M, Pawlak M, Cicens J, Eppenberger-Castori S, Oroszlan P, *et al.* Protein chip based miniaturized assay for the simultaneous quantitative monitorin of cancer biomarkers in tissue extracts. *Proteomics* 2006;:1427-36.
- 157.- Subramain R, Gondi C S, Lakka SS, Jutla A, Rao J S. SiRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2006;28:831-9.
- 158.- Fareed J, Hoppenstedt D, Bick RL, Bacher P. Drug induced alterations of hemostasis and fibrinolysis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:1229-45.
- 159.- Frederick S E and Scott H G. Bleeding Disorders in cancer. *Sem Oncol* 1990;17:187-197.
- 160.- Stietes D P, Terr A I, Parslow T G. *Inmunología Básica y Clínica*. 8ª Edicion. México D.F. Editorial Manual Moderno 1984.