

PARTE 12 Investigación del laboratorio de fibrinólisis

Silmara Montalvão

TEMAS TRATADOS

- ✓ Tiempo de lisis de coágulos de plasma inducido por tPA
- ✓ Ensayo de generación de plasmina

La fibrinólisis es una serie de reacciones enzimáticas que degradan la fibrina insoluble y depende de la cantidad y calidad de diversas enzimas fibrinolíticas, como el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y la plasmina, sus respectivos inhibidores, el inhibidor activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el alfa-2-antiplasmina (a2AP), así como de la estructura del coágulo (Longstaff y Kolev, 2015). En un entorno clínico, el aumento de la tasa de fibrinólisis se utiliza para revertir la oclusión trombótica (p. ej., tPA recombinante para el tratamiento agudo del accidente cerebrovascular, el infarto de miocardio o la embolia pulmonar), mientras que la disminución de la tasa fibrinolítica se utiliza para reducir el sangrado (p. ej., ácido tranexámico para el tratamiento agudo del accidente cerebrovascular, el infarto de miocardio o la embolia pulmonar) (Draxler y Medcalf, 2015; Ilich et al, 2017; Kwaan et al, 2017). Recientemente, en hemofilia, se han utilizado ensayos que miden la formación de coágulos y la fibrinólisis para facilitar las comparaciones directas y funcionales entre agentes hemostáticos nuevos y emergentes que presentan diferentes mecanismos de acción (Hoile et al, 2024). Sin embargo, las pruebas globales para identificar el potencial fibrinolítico de un individuo no se implementan ampliamente. Por el contrario, la investigación básica de fibrinólisis se basa generalmente en la cuantificación de los diversos factores fibrinolíticos. Las concentraciones totales se miden mediante ensayos basados en antígenos y pruebas funcionales específicas para determinar su actividad. A pesar de la variedad de ensayos disponibles, sigue siendo un desafío asignar factores fibrinolíticos individuales que contribuyan al resultado fibrinolítico general debido a la naturaleza dinámica del entorno que rodea al coágulo (Longstaff, 2018). Durante décadas, los ensayos de lisis de coágulos controlados por turbidez se han utilizado como método estándar para cuantificar el potencial fibrinolítico general de una muestra, y se han desarrollado variaciones de este ensayo global y simplista para abordar las funciones de los factores fibrinolíticos. En este contexto, se han explorado dos ensayos en el contexto de la práctica clínica y muestran resultados prometedores para su uso en la evaluación del potencial fibrinolítico general.

Tiempo de lisis de coágulos de plasma inducido por tPA: Los tiempos de lisis de coágulos de plasma inducidos por activadores de plasminógeno se reportan con frecuencia para evaluar y cuantificar la propiedad fibrinolítica general de una muestra (Longstaff, 2018). Esta prueba se realiza mediante la adición simultánea de agonistas para iniciar la coagulación (p. ej., factor tisular y Ca^{2+}) y fibrinólisis (p. ej., tPA) al plasma citratado. Alternativamente, los coágulos pueden generarse primero y luego cubrirse con tPA para imitar el escenario clínico en el que se infunde tPA para degradar los trombos isquémicos existentes (Longstaff et al, 2011). La simplicidad del sistema de reacción y el mínimo procesamiento de muestras hacen de este ensayo un método ideal para investigar la susceptibilidad de los coágulos de plasma a la fibrinólisis (Hoile et al, 2024). La prueba también es sensible a las moléculas inhibidoras que se dirigen a factores específicos, como PAI-1 y a2AP, que pueden incluirse para inferir las funciones respectivas de PAI-1 y a2AP en la fibrinólisis general (Zheng et al, 2023).

Reactivos y método:

- Fosfolípidos [4 μM final]
- CaCl_2 [10 mM final]

- Factor tisular [dilución 1:15.000 de Innovin, factor tisular final 1 μ M]
 - Solución salina tamponada con HEPES (20 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl)
 - tPA (0,5 μ g/ml final)
- 1) En una placa de 96 pocillos con fondo en U, pipetee 10 μ l TF/PL/rtPA en cada pocillo (pipeteo inverso hasta el fondo del pocillo)
 - 2) Agregue 40 μ l de PPP en cada pocillo (pipeteo inverso al lado del pocillo en la parte superior)
 - 3) Precaliente la placa en la incubadora durante 5 min
 - 4) Después de 5 minutos de precalentamiento, use una pipeta multicanal para transferir 10 μ l Ca, mezcle bien y evite crear burbujas.
 - 5) Coloque rápidamente la placa en el lector de placas y comience a leer
 - 6) Controle la reacción durante 2 horas midiendo la turbidez a 405 nm cada 12 segundos con un lector de placas.

Ensayo de generación de plasmina: Los ensayos de generación de plasmina desarrollados por varios grupos comparten algunos elementos comunes (Longstaff, 2018; Zheng et al, 2023). En general, la actividad procoagulante en el ensayo de generación de plasmina se inicia mediante la adición de factor tisular exógeno al plasma recalcificado, y la actividad fibrinolítica se desencadena mediante la adición de tPA exógeno. La generación de plasmina se detecta a través de la escisión de un sustrato fluorogénico, y los parámetros se definen a partir de la acumulación de fluorescencia o mediante una derivada matemática de esta curva de fluorescencia. Las diferencias sutiles entre estos ensayos incluyen las concentraciones de factor tisular y tPA utilizadas y si se usa plasma diluido o no. Algunas variaciones de estos ensayos detectan la trombina y la plasmina simultáneamente, mientras que otras realizan estas mediciones por separado, pero en paralelo. Los estudios demuestran que estos ensayos son específicos para la plasmina y sensibles a la a2AP, y la actividad medida representa la plasmina libre. La generación de plasmina también es sensible al ácido tranexámico. Teniendo en cuenta las altas concentraciones de tPA necesarias para desencadenar la generación de plasmina medible, la prueba no es sensible a las concentraciones plasmáticas de PAI-1 (Miszta et al, 2021). Sin embargo, la respuesta de la generación de plasmina a la adición de tPA exógeno depende de la dosis. Un creciente cuerpo de trabajo sugiere que los ensayos de generación de plasmina, especialmente cuando se utilizan con ensayos de generación de trombina y turbidez, producen una impresión multidimensional de los efectos integrados de las actividades procoagulantes y fibrinolíticas en la salud y la enfermedad (Miszta et al, 2021; Zheng et al, 2023).

Reactivos y método:

- Solución salina tamponada (TBS) Tris, que contiene 66 mM de Tris y 130 mM de NaCl
 - 34 mM de CaCl_2
 - 10 μ M de factor tisular (factor tisular humano recombinante lipidado, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania)
 - 900 ng/ml de tPA (activador tisular recombinante del plasminógeno de dos cadenas, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Alemania)
 - α -trombina (BOC-VAL-PrO-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmina (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Prepare la solución reactiva con 34 mM de CaCl_2 , 10 μ M de factor tisular y 900 ng/ml de tPA en la solución de TBS. La concentración final de reactivos en plasma fue de 5 μ M TF y 450 ng/ml de tPA.
 - 2) Se prepararon dos sustratos con una concentración final de 100 μ M y se utilizaron para la detección de las enzimas: α -trombina y plasmina.
 - 3) Los dos primeros pocillos de la placa (Greiner, 96 pocillos, fondo plano, negro transparente) deben usarse como blanco, y las muestras se corrieron por duplicado en filas paralelas para cada sustrato, evitando posibles interferencias y/o interacciones en la detección de señales.

- 4) Añadir soluciones de sustrato (20 µl) a los pocillos de la placa, seguidas de 90 µl de las muestras y del blanco (solución TBS).
- 5) Con una pipeta automática multipunta, añade 90 µl de la solución de reacción precalentada (37 °C durante 3 min) a cada pocillo de la placa.
- 6) Finalmente, la placa debe leerse en la longitud de onda del fluorímetro de excitación de 340 nm y emisión de 450 nm durante 4 horas a intervalos de 45 segundos.
- 7) El análisis de datos se puede realizar utilizando el software Microsoft® Excel®. Las curvas para la trombina y la plasmina deben generarse calculando el promedio en cada punto de tiempo para los pocillos de plasma duplicados, restando los valores de lectura del blanco (para la trombina y la plasmina por separado). Parámetros que se calcularán en ambos ensayos, utilizando las herramientas de la aplicación Shiny: inicio (tiempo hasta el punto de inflexión antes del aumento de la turbidez), tasa máxima (pendiente de una línea ajustada a la tasa máxima de aumento de la turbidez utilizando 5 a 10 puntos para determinar la línea), tiempo hasta la meseta/pico (tiempo hasta la meseta de turbidez [formación de coágulos] o pico [fibrinólisis]), cambio de turbidez (turbidez máxima del coágulo menos la turbidez inicial), y área bajo la curva (ABC) (calculada como la suma de los trapecios formados por las curvas de turbidez).

Referencias

Draxler DF, Medcalf RL. El sistema fibrinolítico, ¿más que fibrinólisis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.

Hoile LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Los ensayos de formación de coágulos y fibrinólisis revelan diferencias funcionales entre los agentes hemostáticos en el plasma de la hemofilia A. *Res Pract Thromb haemost* 2024; 8(1): 102337.

Ilich A, Bokarev I, Key NS. Ensayos globales de fibrinólisis. *IntJ Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.

Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinólisis: Bioquímica, aspectos clínicos y potencial terapéutico. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.

Longstaff C. Desarrollo de herramientas de aplicaciones Shiny para simplificar y estandarizar el análisis de los datos del ensayo de hemostasia: Comunicación del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.

Longstaff C. Medición de la fibrinólisis: de la investigación a los ensayos de diagnóstico de rutina. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.

Longstaff C, Kolev K. Mecanismos básicos y regulación de la fibrinólisis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.

Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabo L, Kolev K. La interacción entre los dominios activadores tisulares del plasminógeno y las estructuras de fibrina en la regulación de la fibrinólisis: estudios cinéticos y microscópicos. *Sangre* 2011; 117(2): 661-668.

Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de La at B. Evaluación de la generación de plasmina en la salud y la enfermedad. *IntJ Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.

Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Ensayos para cuantificar fibrinólisis: Fortalezas y limitaciones. Comunicación del Comité Científico y de Normalización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia sobre fibrinólisis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.