

## ESTUDIOS DE FIBRINOFORMACIÓN Y FIBRINOLISIS EN PLASMA DE PACIENTES CON ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO

Medeiros Romina<sup>1</sup>, Larramendi José<sup>1</sup>, Gaiero Camila<sup>1</sup>, Mattos Carlos<sup>1</sup>, López Elizabeth<sup>1</sup>, Rossi Silvina<sup>2</sup>, Borthagaray Graciela<sup>1</sup>, Miraballes Iris<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Bioquímica Clínica y Hematología, Laboratorio Central del Hospital Maciel, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Unidad de Inmunología Clínica, Laboratorio de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República, Canelones, Uruguay

### Resumen

El estudio tiene como objetivo evaluar las diferencias en la formación y lisis de fibrina (Fb) entre pacientes con accidente cerebrovascular isquémico (ACVi) y controles. Se busca comprender las variaciones en la dinámica de la fibrinoformación y fibrinólisis, y cómo estas pueden estar relacionadas con el riesgo de desarrollar ACVi.

Se realizaron estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinólisis en plasma de 52 pacientes con ACVi y en controles, utilizando un ensayo turbidimétrico basado en la medición continua de la absorbancia durante la formación y lisis del coágulo. El plasma se activó con factor tisular recombinante y  $\text{Ca}^{2+}$ , luego se añadió tPA para inducir la lisis del coágulo. Se analizaron parámetros derivados de las curvas obtenidas: el tiempo de coagulación (Tc), la absorbancia máxima y el tiempo de fibrinólisis (Tf), y se compararon entre los diferentes grupos.

Los pacientes con ACVi presentaron un Tc significativamente mayor ( $877 \pm 64$  s) comparado con los controles con factores de riesgo (CCFR) ( $707 \pm 69$  s) y sin factores de riesgo (CSFR) ( $679 \pm 79$  s). Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en la absorbancia máxima, los pacientes con ACVi mostraron una absorbancia máxima ligeramente superior ( $0.7676 \pm 0.0524$  UA) en comparación con los controles. El Tf fue significativamente mayor en pacientes con ACVi ( $1602 \pm 124$  s) que en los controles CCFR ( $1340 \pm 101$  s) y CSFR ( $1371 \pm 140$  s). En la relación Tf/Tc no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Estos resultados sugieren que los pacientes con ACVi tienen una fibrinoformación más lenta y una fibrinólisis más prolongada, lo que podría contribuir a la patogénesis del ACVi.

Palabras clave: Fibrinógeno, Accidente Cerebrovascular Isquémico, Fibrinólisis, Coagulación, Trombosis

## Introducción

*Accidente Cerebrovascular Isquémico.* Durante un accidente cerebrovascular isquémico (ACVi), el cual representa el 85% de los accidentes cerebrovasculares (ACV), ocurre una situación de isquemia cerebral aguda (ICA). El ACVi se define como el rápido desarrollo de signos clínicos de una disfunción neurológica, debido a infarto. Según las Estadísticas Sanitarias Mundiales del 2019 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ACV es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad a nivel mundial. Globalmente, 3.3 millones de personas murieron por ACVi en 2019, con una incidencia anual de 7.6 millones y una prevalencia de 77.2 millones.<sup>1</sup> Es una de las principales causas de morbilidad a nivel global, con consecuencias invalidantes en los sobrevivientes, y una alta incidencia de eventos secundarios, representando un problema de salud pública con elevado costo sanitario.

El mecanismo de un ACVi implica la disminución o el bloqueo del suministro de sangre al cerebro debido a un trombo o engrosamiento del endotelio luminal, originado por hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis o un estado inflamatorio, llevando a un estado de ICA. La patogenia de la ICA es extremadamente compleja e involucra múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentra la generación de radicales libres, los cuales contribuyen al daño neuronal estructural y funcional, a través de su interacción nociva con un gran número de moléculas proteicas, lipídicas y nucleares, y de la iniciación de vías de señalización intracelulares.<sup>2,3</sup>

*Distrés nitroxidativo.* Las células utilizan oxígeno ( $O_2$ ) para generar energía y forman especies reactivas radicalarias y no radicalarias, con propiedades oxidantes y nitrantes, como resultado principalmente de la producción de adenosín trifosfato (ATP) mitocondrial. La producción de oxidantes biológicos es necesaria para mantener la homeostasis celular y se ha demostrado que es crucial para los procesos fisiológicos.<sup>4</sup> Más específicamente, las especies reactivas superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) son productos de la función celular normal y se utilizan en varios procesos fisiológicos. Esto incluye la señalización celular, la respiración mitocondrial, la vasodilatación y la defensa celular durante la fagocitosis por células inmunitarias como los neutrófilos. Esos agentes reactivos, si no son detenidos por la acción de antioxidantes, que forman especies no tóxicas, forman parte de una cadena de propagación donde se combinan con otros para formar especies más dañinas.<sup>5</sup>

Cuando las especies reactivas se producen en exceso y no son equilibradas por la capacidad antioxidante, puede producirse estrés oxidativo y efectos adversos asociados. El estrés oxidativo se clasifica de acuerdo a la intensidad, desde lo fisiológico (eustrés) al estallido tóxico que daña biomoléculas (distrés). Dada la gran diversidad de oxidantes con sus amplios rangos de reactividad química y biológica, se han definido varios subtipos de estrés oxidativo, de acuerdo a la forma en que se generan.<sup>6</sup> Uno de esos subtipos es el estrés nitroxidativo (estrés oxidativo y nitrativo) que representa la actividad nitrativa del peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).<sup>7</sup> Entonces, el distrés nitroxidativo es un proceso en el cual la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) supera los mecanismos antioxidantes generando un desbalance a favor de las primeras. Estas especies reaccionan con biomoléculas como proteínas, alterando su estructura y función.<sup>8,9</sup>

*Fibrinógeno y Fibrina.* El Fibrinógeno humano (Fg) es una macromolécula glicoproteica de síntesis hepática, cuya masa es de aproximadamente 340 kDa, y

vida media de unos 4 días. Constituye el 4% del total de las proteínas plasmáticas, lo cual lo convierte en una de las mayoritarias, con una concentración fisiológica de entre 200 y 400 mg/dL. Tiene un papel central en la hemostasia, formando las redes de Fibrina (Fb) del coágulo, aunque no es su única función.<sup>10</sup>

Se ha observado que el Fg es particularmente susceptible a modificaciones postraduccionales nitroxidativas (PTMs),<sup>11,12</sup> siendo afectadas su estructura y función en la hemostasis, y también se ha observado la presencia de Fg nitrado en ACVi.<sup>13,14</sup>

La Fb (y el Fg) puede ser caracterizada por diferentes propiedades, las más estudiadas son la cinética de formación y lisis de la Fb, la estructura, la permeabilidad, elasticidad y compactabilidad del coágulo formado.<sup>15</sup>

*Hemostasis primaria y secundaria.* La hemostasis es un proceso complejo que tiene como objetivo detener el sangrado cuando se produce una lesión en un vaso sanguíneo. Este sistema implica una serie de reacciones en cascada que resultan en la formación de un coágulo de Fb, que luego es degradado para mantener el equilibrio. Además, involucra mecanismos inhibitorios y activadores que hacen que este proceso esté finamente regulado.<sup>16</sup> Consta de cinco fases. (1) Fase vascular: ocurre vasoconstricción tras la pérdida de integridad de las paredes vasculares y daño de las células endoteliales vasculares por una lesión en el vaso sanguíneo. En este momento el músculo liso del vaso sanguíneo se contrae para minimizar la pérdida de sangre. (2) Fase plaquetaria (o hemostasis primaria): en primer lugar, ocurre la captura y adhesión plaquetaria donde las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión, especialmente a las proteínas del subendotelio expuestas como el colágeno y VWF; luego ocurre la activación plaquetaria (secreción, agregación y contracción) donde las plaquetas se activan y cambian de forma (spreading), liberando sustancias químicas (granulaciones) que reclutan más plaquetas al sitio de la lesión; y finalmente la agregación plaquetaria donde las plaquetas se agregan, formando un tapón plaquetario temporal. (3) Fase de la coagulación (o hemostasis secundaria) en la cual se da la cascada de coagulación y la formación de Fb. La cascada de coagulación es una serie de reacciones enzimáticas en las que participan factores de coagulación, que se puede dividir, para su estudio, en tres vías: intrínseca, extrínseca y común. La vía intrínseca (también llamada vía de contacto) se activa por el contacto de la sangre con superficies cargadas negativamente (p. ej., colágeno), e incluye los factores XII, XI, IX y VIII. La vía extrínseca (también llamada vía del factor tisular [TF]) se activa por el TF liberado por las células dañadas, e incluye el factor VII y el complejo TF-fVIIa. La vía común es la convergencia de ambas vías en la activación del factor X. Esto lleva a la conversión de protrombina (factor II) en trombina (factor IIa). La trombina convierte el Fg en Fb al clivar los FpA y FpB, y ésta polimeriza para formar una red insoluble que estabiliza el coágulo plaquetario.<sup>17</sup> (4) Fase de retracción del coágulo: las plaquetas contraen el coágulo para reducir su tamaño y facilitar la reparación del tejido. (5) Fase de fibrinólisis: una vez que el vaso sanguíneo está reparado, el coágulo de Fb es degradado por el sistema fibrinolítico, principalmente mediante la acción de la plasmina.

*Fibrinólisis.* La fibrinólisis es el proceso fisiológico continuo de ruptura del coágulo de Fb y, normalmente, está estrictamente regulado para mantener el equilibrio entre la formación y la lisis de la Fb. Este equilibrio asegura la hemostasis en caso de daño en la pared del vaso, mientras que previene la formación excesiva de Fb

y la obstrucción del suministro de sangre. Como ya se indicó, al activarse el sistema de coagulación, el Fg circulante se convierte en Fb, y el coágulo de Fb se estabiliza mediante entrecruzamiento por el fXIIIa. La plasmina es la principal proteasa fibrinolítica y circula en la sangre en su forma de zimógeno, el plasminógeno. La Fb reticulada proporciona una superficie de unión para el plasminógeno, que luego es convertido en plasmina por el tPA (activador del plasminógeno tisular). La fibrinólisis está regulada por las proteínas antifibrinolíticas,  $\alpha$ 2-AP, el PAI-1 y -2, y el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Finalmente, la estructura del propio coágulo de Fb influye en la fibrinólisis, ya que se ha encontrado que los coágulos de Fb más densos con poros más pequeños son menos susceptibles a la lisis, probablemente porque la unión del plasminógeno y del tPA a la Fb se ve obstaculizada por el menor tamaño de los poros.

### **Justificación**

La fibrinólisis alterada ocurre en una variedad de contextos clínicos. Sin embargo, los ensayos de coagulación rutinarios actuales, como el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el tiempo de protrombina (PT), no son sensibles a la fibrinólisis. Los productos de degradación de Fb circulantes en niveles altos indican un aumento en el recambio de Fb, pero usualmente reflejan más una actividad procoagulante aumentada con formación de Fb que una hiperfibrinólisis. Por lo tanto, resultaría útil un método para evaluar la capacidad fibrinolítica en la investigación y en el laboratorio clínico.

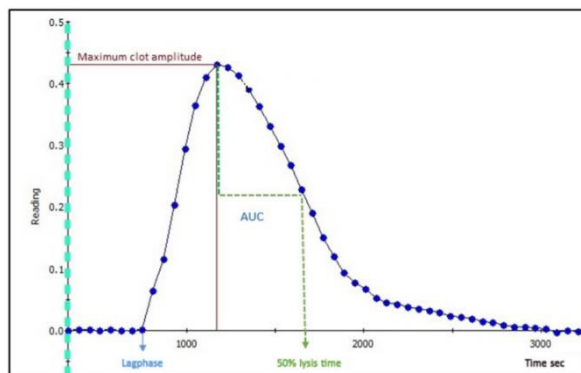
*Estudios de Formación y Lisis del Coágulo.* La cinética de formación del coágulo se puede estudiar determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo, obteniéndose perfiles de turbidez que son curvas sigmoideas o exponenciales que son caracterizadas mediante tres parámetros: la fase lag, la pendiente y la DO máxima.<sup>18</sup> La fase lag sólo está presente en las curvas sigmoideas y se corresponde al tiempo de inicio de la coagulación. La pendiente representa la velocidad de fibrinoformación. Y la DO máxima está asociada a la densidad de la estructura final de la Fb.<sup>19</sup>

Para evaluar además otra de las características de la Fb, su lisabilidad, se puede utilizar un método densitométrico cinético, registrando la DO en función del tiempo y determinando el tiempo de lisis luego de la formación del coágulo, agregando de un agente trombolítico como tPA.<sup>20</sup> Este método es el que se utiliza en los experimentos del presente trabajo, e implica la generación de curvas de fibrinoformación y fibrinólisis del coágulo, de los cuales se derivan parámetros como la fase lag (tiempo hasta la formación inicial de Fb), tiempo de coagulación (Tc, tiempo que transcurre entre que termina la fase lag y se llega a la absorbancia máxima); absorbancia máxima (máxima concentración de Fb en la cubeta), integral o área bajo la curva (formación neta de Fb), y el tiempo de lisis al 50% (tiempo desde el pico hasta el 50% de la lisis del coágulo). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de curva de fibrinoformación y fibrinólisis de coágulo.<sup>21</sup>

### **Objetivos**

*Objetivo General:* Evaluar las diferencias en la formación y lisis de fibrina entre pacientes con ACVi y controles, para comprender cómo las variaciones en la dinámica de la fibrinoformación y fibrinólisis pueden estar relacionadas con el riesgo de desarrollar ACVi.

**Objetivos Específicos.** Comparar el tiempo de coagulación (Tc) entre pacientes con ACVi y controles con y sin factores de riesgo. Analizar la absorbancia máxima durante la formación del coágulo entre pacientes con ACVi y los grupos de control. Evaluar y comparar el tiempo de fibrinolisis (Tf) entre pacientes con ACVi y los grupos de control. Investigar la relación Tf/Tc entre los diferentes grupos para determinar si existen diferencias significativas en la dinámica de la fibrinoformación y fibrinolisis.



**Figura 1. Curva de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo esperada.** Se observa la forma y los parámetros derivados de una curva de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo. La forma y los valores de referencia de los parámetros puede variar considerablemente con el tipo y la concentración de activadores de la coagulación, tPA y  $Ca^{2+}$  utilizados. Extraído Larsen & Hvas.21

## Materiales y Métodos

**Datos Clínicos y Aspectos Éticos.** Se realizó un estudio observacional, analítico, de casos y controles en pacientes consecutivos que consultaron en el Departamento de Emergencia del Hospital Maciel, con diagnóstico clínico-imagenológico de ACVi, que cumplieran con los criterios de la OMS. Los pacientes fueron evaluados por integrantes del equipo de medicina interna, quienes aplicaron un protocolo preestablecido de recolección de sangre y datos con variables afines a la investigación. El criterio de inclusión fue la presencia de un ACVi de menos de 36 horas de evolución y haber firmado el paciente o un familiar a cargo el consentimiento informado de participación en el estudio. La confirmación del diagnóstico clínico, su naturaleza, topografía y la extensión de la lesión se determinó mediante una tomografía axial computada de cráneo sin contraste.

Además, se recolectó una muestra de sangre, información demográfica e historial familiar y personal de enfermedades cardiovasculares de pacientes ambulatorios sin ACVi (grupos control).

El protocolo fue examinado y aprobado por el Comité de Bioética y Protocolos de Investigación del Hospital Maciel, el cual sigue los estándares éticos establecidos en el Decreto Ministerial 158/19 relativo a la investigación en seres humanos, y en la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

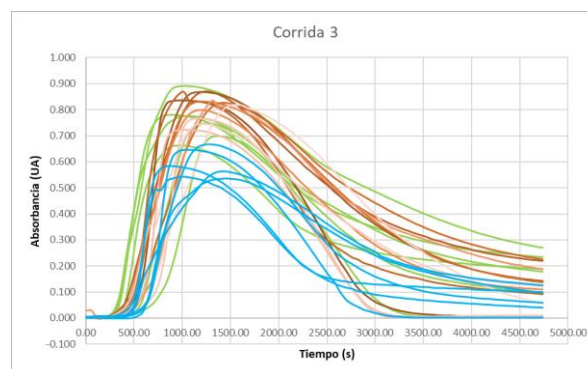
**Estudios de Fibrinoformación y Fibrinolisis.** Se realizaron estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinolisis en pacientes con ACVi y controles. Utilizando el equipo Multiskan EX y el protocolo descrito por Larsen & Hvas<sup>21</sup> se planteó realizar estudios que permitan evaluar de manera simultánea la formación y lisis del coágulo. En primer lugar, se realizaron pruebas con muestras de pacientes

sanos, con el fin de poner a punto la técnica. Se mezcló plasma pobre en plaquetas citratado, con un activador de la coagulación (factor tisular [TF] recombinante) y con fosfolípidos y  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la formación de Fb (Recombilastin 2G, HemosIL). Simultáneamente se agregó tPA para inducir la lisis (Actilyse, Boehringer Ingelheim). Se emplea un principio turbidimétrico dado que la red de Fb primero se forma y luego se lisa en la cubeta con lo que la turbidez aumenta y luego disminuye. Se registró la absorbancia continuamente durante 1.5 horas para generar curvas de formación-lisis del coágulo que muestran la absorbancia medida en función del tiempo, las cuales son analizadas posteriormente.

Para cada muestra se obtuvo una curva de fibrinoformación y fibrinolisis (por duplicado), y de éstas se extrajeron los siguientes parámetros: altura de pico, tiempo de fibrinoformación o tiempo de coagulación ( $T_c$ , definido como el tiempo desde que comienza la Fibrinoformación, cuando la derivada cambia de 0 a un valor positivo, hasta el tiempo del pico), tiempo de fibrinolisis ( $T_f$ , definido como el tiempo a partir del pico hasta que termina la fibrinolisis (cuando la derivada cambia de un valor negativo a 0)) y relación entre estos. Se comprobó la distribución gaussiana y luego se compararon los resultados entre grupos mediante test de hipótesis para dos muestras independientes.

## Resultados

Se realizaron los estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinolisis en 52 pacientes con ACVi y en controles sin ACVi ni antecedentes de ACVi. Dentro de los controles sin ACVi, se estudiaron 22 muestras de pacientes sin factores de riesgo para desarrollar un ACVi (CSFR), (HTA, DM, dislipemia, consumo de tabaco, o antecedente de ACVi) y 37 de controles de población general con algún factor de riesgo (CCFR), en duplicados. Se evaluó la formación del coágulo *ex vivo* y se obtuvieron curvas de fibrinoformación y fibrinolisis que permiten visualizar el comportamiento de la formación y lisis del coágulo de cada muestra. La Figura 2 muestra las curvas obtenidas en una de las corridas realizadas.



**Figura 2. Curvas de fibrinoformación y fibrinolisis de coágulo obtenidas.** Se observan todas las curvas obtenidas en la corrida 3. Controles sin factores de riesgo (CSFR): verde. Controles con factores de riesgo (CCFR): azul. ACVi: diferentes tonalidades de naranja. Se puede ver una forma similar para los 3 grupos.

Se puede observar que las curvas de fibrinoformación y fibrinolisis presentan la forma esperada, con una fase lag, una pendiente positiva que indica el comienzo de la formación del coágulo, un pico, y finalmente una pendiente negativa que se va volviendo menor. En cuanto a los parámetros derivados como pico de absorbancia, integral bajo la curva y 50% del tiempo de lisis, estos se encuentran cercanos a los intervalos de referencia planteados por Neergaard-Petersen *et al.*<sup>22</sup> que se muestran en la Tabla 1, con la interpretación de las posibles alteraciones.

Tabla 1. Interpretación de parámetros derivados de curvas de formación y lisis de coágulo

| Parámetro               | Interpretación  | Intervalo de referencia | Alteraciones   |
|-------------------------|---|-------------------------|--|
| Absorbancia máxima (UA) | Máxima concentración de Fb alcanzada en el pocillo.   | 0.18 – 0.74             | ↑: Actividad procoagulante aumentada; alto Fg plasmático.<br>↓: Actividad procoagulante disminuida, puede deberse a bajos niveles plasmáticos de factores de coagulación o Fg  |
| Integral (UA*s)         | Formación neta de Fb. Equilibrio entre la formación y descomposición de Fb.                     | 219 – 1051              | ↑: Actividad procoagulante aumentada; actividad anticoagulante endógena disminuida; capacidad fibrinolítica disminuida<br>↓: Actividad procoagulante o estabilidad del coágulo disminuida, puede deberse a bajos niveles circulantes de factores de coagulación, Fg o fXIII; actividad fibrinolítica aumentada |
| Lisis 50%               | Tiempo desde que se alcanza la máxima concentración de Fb hasta que se lisa el 50% del coágulo. | 309 – 1565              | ↑: Capacidad fibrinolítica disminuida, puede deberse a bajos niveles circulantes de plasminógeno, altos niveles de PAI-1 y/o TAFI o tratamiento antifibrinolítico<br>↓: Actividad fibrinolítica aumentada, puede deberse a altos niveles plasmáticos de tPA o uPA  |

En el presente trabajo se hizo foco en el tiempo de fibrinoformación o coagulación (Tc), en la altura de pico (o absorbancia máxima) y en el tiempo de fibrinolisis (Tf). En cuanto a los Tc (desde el comienzo de formación del coágulo hasta el máximo del pico) se observa una media  $\pm$  IC95% de  $679 \pm 79$  s para los CSFR,  $707 \pm 69$  s para los CCFR y  $877 \pm 64$  s para los ACVi. El test estadístico realizado comparando los Tc de los grupos CSFR y CCFR arrojó un p de 0.61. Comparando los Tc del grupo CCFR y ACVi se obtuvo un p de 0.0006. El valor del Tc es mayor en el grupo ACVi con significancia estadística (Figura 3).

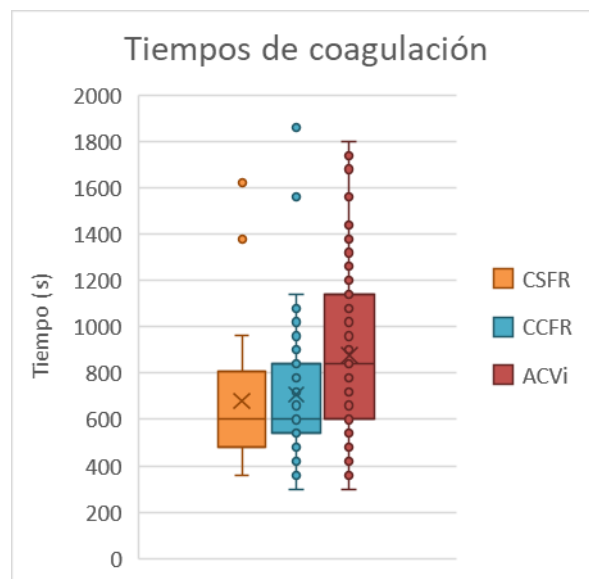
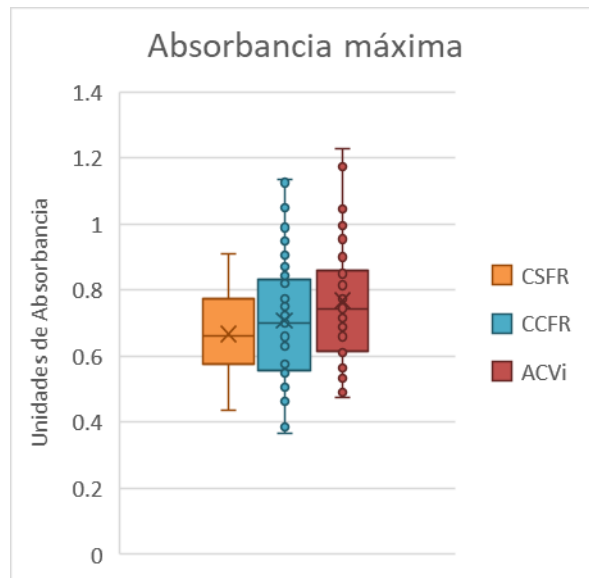


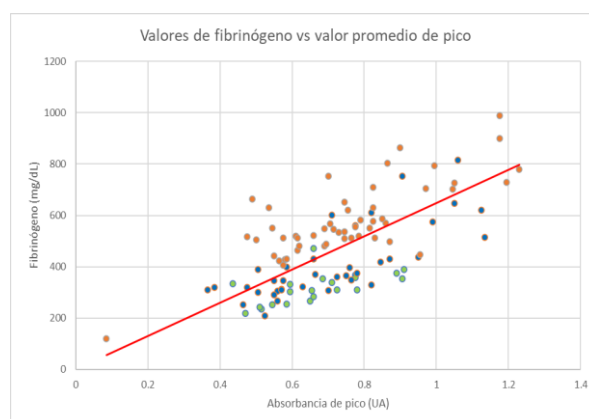
Figura 3. Distribución de tiempos de coagulación en cada grupo clínico estudiado. Distribución de tiempos de coagulación (Tc) para cada grupo. Se toma como Tc desde que comienza el proceso de formación del coágulo hasta el tiempo del pico máximo. CCFR y CSFR:  $p = 0.61$ . CCFR y ACVi:  $p = 0.0006$ . Existe una diferencia significativa entre grupo ACVi y grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: naranja. CCFR: azul. ACVi: rojo.

En cuanto a la absorbancia máxima obtenida para cada grupo, el grupo CSFR presento una media  $\pm$  IC95% de  $0.6684 \pm 0.0549$  UA, el grupo CCFR  $0.7091 \pm 0.0646$  UA y el grupo ACVi  $0.7676 \pm 0.0524$  UA. El análisis estadístico arrojó un p de 0.36 al comparar los grupos CSFR y CCFR, y un p de 0.12 al comparar los grupos CCFR y ACVi, no se observándose diferencias significativas (Figura 4).



**Figura 4. Distribución de absorbancia máxima en cada grupo clínico estudiado.** Distribución de alturas de pico para cada grupo. CCFR y CSFR:  $p = 0.36$ . CCFR y ACVi:  $p = 0.12$ . No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

También se estudió la relación entre la altura de pico obtenida y la concentración de Fg medida mediante el método de Clauss, observándose una tendencia a correlación lineal (Figura 5). Los valores de Fg determinados con el método de Clauss (VR 200 – 400 mg/dL) fueron de  $316.7 \pm 24.3$  mg/dL en el grupo CSFR (valores normales),  $412.6 \pm 45.4$  mg/dL en el grupo CCFR (valores ligeramente aumentados), y  $589.7 \pm 36.3$  mg/dL en el grupo ACVi (valores aumentados).



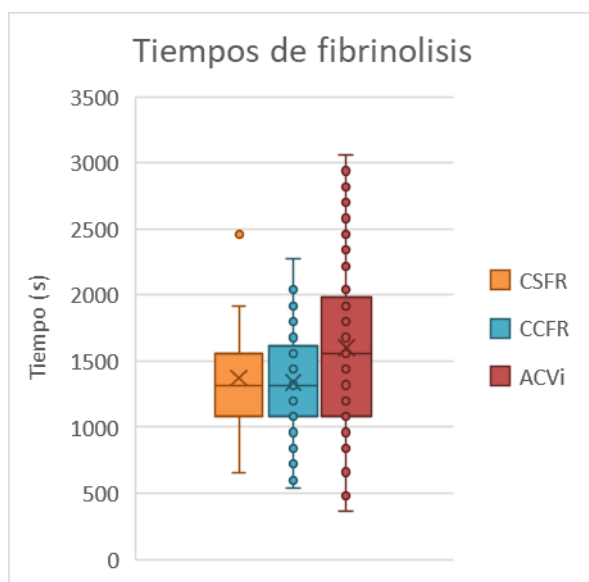
**Figura 5. Correlación de la absorbancia máxima con la concentración de Fibrinógeno en cada individuo estudiado.** Concentración de fibrinógeno en función de la absorbancia máxima, para cada muestra. Se observa una tendencia lineal al relacionar ambos valores, la cual se muestra en la línea roja. CSFR: verde. CCFR: azul. ACVi: naranja.

Finalmente, comparando los Tf (duración de la lisis) se observa una media  $\pm$  IC95% de  $1371 \pm 140$  s para los CSFR,  $1340 \pm 101$  s para los CCFR y  $1602 \pm 124$  s para el grupo ACVi. El análisis estadístico arrojó un p de 0.43 al comparar



los Tf entre los grupos CSFR y CCFR, un valor p de 0.0017 al comparar los Tf entre CCFR y ACVi, y un valor p de 0.018 entre CSFR y ACVi. El grupo ACVi presenta un valor medio mayor a los otros dos grupos, con diferencia estadísticamente significativa (Figura 6).

Al analizar las relaciones Tf/Tc, se obtuvieron valores de  $2.280 \pm 0.292$  para el grupo CSFR,  $2.199 \pm 0.238$  para el grupo CCFR, y  $1.952 \pm 0.146$  para el grupo ACVi, sin observarse diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.61$  entre CSFR y CCFR, y  $p = 0.11$  entre CCFR y ACVi).



**Figura 6. Distribución de tiempos de fibrinólisis en cada grupo clínico estudiado.** Distribución de tiempos de lisis para cada grupo. Se toma como tiempo de lisis desde el tiempo del pico máximo (donde comienza la lisis) hasta el tiempo final. CCFR y CSFR:  $p = 0.43$ . CCFR y ACVi:  $p = 0.0017$ . CSFR y ACVi:  $p = 0.018$ . Existe una diferencia significativa entre grupo ACVi y grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: naranja. CCFR: azul. ACVi: rojo.

## Discusión

La forma de la curva, la tasa de formación y lisis de Fb y por los tanto los valores de referencia para los parámetros derivados varían considerablemente según el tipo y las concentraciones finales de los activadores de la coagulación, el tPA y el  $Ca^{2+}$ . De hecho, se ha demostrado que la activación con TF (como es este caso) resulta en una mayor formación neta de Fb que con trombina, con una formación máxima de Fb más alta, una integral más alta y un tiempo de lisis más prolongado.<sup>23</sup> El ensayo también es sensible a la concentración de tPA, ya que una concentración final más alta de tPA aumenta la lisis neta, lo que conduce a una integral disminuida y tiempos de lisis más cortos. Todo esto hace que la comparación entre laboratorios sea difícil, y que los valores de referencia encontrados en bibliografía se tomen solamente como guía.<sup>24</sup> Por lo tanto, es recomendable el establecimiento de intervalos de referencia locales, para implementar el ensayo con éxito en el laboratorio. En nuestro caso se contó con el conjunto de muestras control para comparar.

Se observaron curvas de fibrinoforración y fibrinólisis que permiten visualizar la tendencia de la formación y lisis de un coágulo. En los parámetros derivados Tc, absorbancia máxima y Tf, y en la relación Tf/Tc, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CSFR y CCFR. Cuando se

compara con el grupo ACVi, se encuentran diferencias con significancia estadística para el Tc y para el Tf, siendo mayor en el grupo ACVi, en ambos casos. Este resultado es concordante con el hecho de que no hay diferencias al comparar las relaciones Tf/Tc entre controles y ACVi. Estos hallazgos apuntan a que los tiempos de coagulación serían mayores en los pacientes con ACVi, es decir que el tiempo que transcurre entre que comienza a formarse el coágulo y este alcanza su máxima turbidez es mayor; y que a su vez la lisis de este coágulo ocurre de forma más lenta. Según la Tabla 1, una lisis aumentada indica que por algún motivo la capacidad fibrinolítica está disminuía.

Otro hallazgo interesante es que la altura de pico de las curvas correlaciona positivamente con la concentración de Fg determinada por el método de Clauss, en todos los grupos estudiados. Y, si bien esos valores de absorbancia no mostraron diferencias significativas, la absorbancia máxima del grupo ACVi es mayor, al igual que la concentración de Fg de este grupo, que se encuentra por encima de los valores de referencia. Estas observaciones coinciden con lo que indica la Tabla 1, que la absorbancia máxima aumentada puede ser causada por un incremento en la concentración de Fg plasmático.

Estos resultados pueden interpretarse como que en los pacientes ACVi el coágulo se forma durante más tiempo, alcanzando una altura de pico consistente con la cantidad de Fg que contienen, y luego tarda más tiempo en ser degradado. Cabe repetir que, sin embargo, la altura de pico no resultó ser diferente a la de los grupos controles.

Se han realizado estudios de este tipo en condiciones clínicas cardiovasculares como síndrome coronario agudo, enfermedad arterial coronaria, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, y ACVi, donde el hallazgo frecuente fue un aumento en el tiempo de lisis.<sup>25,26</sup> También se observó este aumento del Tf en DM, disfunción hepática y sepsis.<sup>27,28,29</sup> En el caso de coágulos de pacientes ACVi, Undas *et al.*,<sup>30</sup> realizaron además estudios de permeación y microscopía electrónica y reportaron que estos presentan una red menos porosa y por tanto menos susceptible a fibrinólisis, siendo más compacta, con una mayor masa de coágulo y con fibras más gruesas. En otro trabajo, se reportan propiedades alteradas de coágulos de pacientes con síndrome coronario agudo, haciéndolos más resistentes a la fibrinólisis, y correlaciona estas características con estrés oxidativo, apuntando al Fg como responsable de las observaciones, por su susceptibilidad a PTMs nitroxidativas, que generan cambios en la funcionalidad del proceso hemostático.<sup>31,32</sup>

Con la premisa de que el Fg de los pacientes con ACVi estaría nitrado, apoyada por los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación,<sup>14,33</sup> resulta interesante preguntarse cómo afectaría esta modificación a la fibrinoformación y fibrinólisis, y si esto es algo que estamos observando. Se han realizado estudios funcionales y de imagen en coágulos conteniendo Fg nitrado *in vivo* e *in vitro*, encontrándose cambios en la cinética, arquitectura, rigidez y fibrinólisis. Parastatidis *et al.*,<sup>34</sup> observaron un aumento en la absorbancia y turbidez final en muestras conteniendo Fg nitrado, un aumento en la velocidad inicial de formación del coágulo, lo cual asocian a una aceleración de la agregación lateral, y un aumento en la firmeza del coágulo, lo cual se asocia a disminución en la tasa de fibrinólisis. Sus hallazgos apuntan a una consecuencia funcional de la nitración del Fg, hacia una ganancia de función de este. Esos hallazgos

concuerdan en parte con lo reportado por Vadseth *et al.*,<sup>35</sup> que al analizar la polimerización de muestras de pacientes con enfermedad coronaria arterial, y muestras de Fg nitrado *in vitro*, hallaron una fase de latencia más corta, un rápido aumento de la velocidad inicial y una turbidez final aumentada. Una diferencia de este reporte con el anterior mencionado, es que no se observó alteración en la lisis.

Otro estudio interesante a comentar es el realizado por Ill-Raga *et al.*,<sup>13</sup> quienes mediante tromboelastometría analizaron trombos formados en condiciones nitroxidantes, y observaron un aumento en el tiempo de formación de Fb, disminución en la firmeza y amplitud del coágulo, e inhibición en la fibrinólisis haciendo los coágulos más estables. Cabe aclarar que en este estudio los cambios observados pueden deberse a una nitración global de proteínas y factores de la cascada de la coagulación y fibrinólisis. Los autores plantean que la nitración de Fg enlentece la formación del coágulo, a la vez que lo hace más resistente a fibrinólisis y que este proceso puede ser una respuesta protectora para modular la coagulación de modo de permitir una perfusión parcial en las etapas iniciales de la hemostasis, pero que en etapa más avanzada del proceso estabiliza el coágulo.

Como se puede ver, los resultados en cuanto a la funcionalidad del Fg cuando está nitrado resultan controversiales, y esto puede deberse a las condiciones de nitración ensayadas, ya que en algunos estudios se utilizan muestras nitradas *in vivo* por el proceso fisiopatológico de distrés nitroxidativo, mientras que otras se tratan de Fg aislado nitrado *in vitro*. En el caso de lo expuesto en el presente trabajo, el Fg habría sido nitrado *in vivo*, y los resultados se asemejan a lo reportado por Ill-Raga *et al.*<sup>13</sup> Sin embargo, existe la necesidad de seguir estudiando la fibrinoformación y fibrinólisis, para corroborar estos resultados. También sería útil la observación de la estructura del coágulo, y la determinación de nitración en el mismo.

## **Conclusiones**

La presente investigación tuvo como objetivo el estudio de la funcionalidad del coágulo formado *ex vivo* a partir de plasma de pacientes con ACVi. Existen múltiples reportes que indican una alteración en las características funcionales observables de estos coágulos, que se atribuyen a cambios estructurales, sin haber evidencia de la causa de esos cambios. Anteriormente, en nuestro grupo de investigación se generó evidencia de la existencia de nitroxidación en el Fg y plasma de pacientes con ACVi,<sup>14,33</sup> también se encontró nitroxidación Fg y otras proteínas de coágulos formados *in vivo* (trombos) en pacientes con ACVi, y se observó mediante experimentos *in silico* cómo la existencia de PTMs nitroxidativas afecta la estructura regional de la molécula de Fg, afectando potencialmente la funcionalidad.<sup>36</sup>

Resulta interesante observar las alteraciones funcionales del coágulo, pues se evidencian clínicamente como una situación protrombótica debido a hipercoagulabilidad o a hipofibrinólisis, o hemorrágica debido a hipocoagulabilidad o hiperfibrinólisis. Del mismo modo, resulta interesante conocer las causas de esos cambios, que pueden ser alteraciones estructurales, causadas a su vez por situación de inflamación y distrés nitroxidativo.

Autor correspondiente: Romina Medeiros. Hospital Maciel, 25 de Mayo 174, 11000 Montevideo, Departamento de Montevideo, Uruguay; +59898692977; [rmedeiros@fq.edu.uy](mailto:rmedeiros@fq.edu.uy)

## Referencias Bibliográficas

- <sup>1</sup> Feigin VL, Stark BA, Johnson CO, Roth GA, Bisignano C, Abady GG, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abedi V, Abualhasan A. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*. 2021 Oct 1;20(10):795-820.
- <sup>2</sup> Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*. 2011 Oct 21;12(10):7199-215.
- <sup>3</sup> Jelinek M, Jurajda M, Duris K. Oxidative stress in the brain: basic concepts and treatment strategies in stroke. *Antioxidants*. 2021 Nov 25;10(12):1886.
- <sup>4</sup> Sies H, Mailloux RJ, Jakob U. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024 Apr 30:1-9.
- <sup>5</sup> Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In *Oxidative stress 2020* Jan 1 (pp. 3-12). Academic Press.
- <sup>6</sup> Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Romanian journal of internal medicine= Revue roumaine de medecine interne*. 2013 Apr 1;51(2):97-106.
- <sup>7</sup> Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007 Jan;87(1):315-424.
- <sup>8</sup> Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 2015 Apr 1;4:180-3.
- <sup>9</sup> Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of amino acids*. 2011;2011(1):207691.
- <sup>10</sup> Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2001 Jun 1;12(6):677-82.
- <sup>11</sup> Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994 Nov 1;17(5):429-37.
- <sup>12</sup> Salman-Tabcheh S, Guérin MC, Torreilles J. Nitration of tyrosyl-residues from extra- and intracellular proteins in human whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995 Nov 1;19(5):695-8.
- <sup>13</sup> Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernández E, Guix FX, Bosch-Morató M, Guivernau B, Tajés M, Valls-Comamala V, Jiménez-Conde J, Ois A, Pérez-Asensio F. Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015 Mar 1;1852(3):421-8.
- <sup>14</sup> Medeiros R, Sousa B, Rossi S, Afonso C, Bonino L, Pitt A, López E, Spickett C, Borthagaray G. Identification and relative quantification of 3-nitrotyrosine residues in fibrinogen nitrated in vitro and fibrinogen from ischemic stroke patient plasma using LC-MS/MS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021 Mar 1;165:334-47.
- <sup>15</sup> MOESSON MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2005 Aug 1;3(8):1894-904.
- <sup>16</sup> Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2023 Aug 23.
- <sup>17</sup> Du J, Wang J, Xu T, Yao H, Yu L, Huang D. Hemostasis strategies and recent advances in nanomaterials for hemostasis. *Molecules*. 2023 Jul 7;28(13):5264.
- <sup>18</sup> Blombäck B, Okada M. Fibrin gel structure and clotting time. *Thrombosis research*. 1982 Jan 1;25(1-2):51-70.
- <sup>19</sup> Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Åslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1989 Jul 27;997(1-2):96-110.

- 
- <sup>20</sup> Beebe DP, Aronson DL. An automated fibrinolytic assay performed in microtiter plates. *Thrombosis research*. 1987 Jul 1;47(1):123-8.
- <sup>21</sup> Larsen JB, Hvas AM. Fibrin clot formation and lysis in plasma. *Methods and Protocols*. 2020 Sep 25;3(4):67.
- <sup>22</sup> Neergaard-Petersen S, Mogensen VB, Veirup MS, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Fibrin clot lysis assay: establishment of a reference interval. *Thrombosis Research*. 2018 Jul 1;167:9-11.
- <sup>23</sup> Veirup MS, Mogensen VB, Neergaard-Petersen S, Hvas AM. Fibrin clot lysis analysis: Tissue factor versus thrombin as activator. *Proceedings of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. 2019.
- <sup>24</sup> Pieters M, Philippou H, Undas A, de Lange Z, Rijken DC, Mutch NJ. An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018 May 1;16(5):1007-12.
- <sup>25</sup> Lisman T, De Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1102-5.
- <sup>26</sup> Ząbczyk M, Natorska J, Janion-Sadowska A, Metzgieer-Gumiela A, Polak M, Plens K, Janion M, Skonieczny G, Mizia-Stec K, Undas A. Prothrombotic fibrin clot properties associated with NETs formation characterize acute pulmonary embolism patients with higher mortality risk. *Scientific Reports*. 2020 Jul 10;10(1):11433.
- <sup>27</sup> Neergaard-Petersen S, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL, Larsen SB, Phoenix F, Kurdee Z, Grant PJ, Ajjan RA. The influence of type 2 diabetes on fibrin clot properties in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;112(12):1142-50.
- <sup>28</sup> Bos S, van den Boom B, Kamphuisen PW, Adelmeijer J, Blokzijl H, Schreuder T, Lisman T. Haemostatic profiles are similar across all aetiologies of cirrhosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2019 Feb;119(02):246-53.
- <sup>29</sup> Semeraro F, Colucci M, Caironi P, Masson S, Ammollo CT, Teli R, Semeraro N, Magnoli M, Salati G, Isetta M, Panigada M. Platelet drop and fibrinolytic shutdown in patients with sepsis. *Critical care medicine*. 2018 Mar 1;46(3):e221-8.
- <sup>30</sup> Undas A, Slowik A, Wolkow P, Szczudlik A, Tracz W. Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: relation to neurological deficit. *Thrombosis research*. 2010 Apr 1;125(4):357-61.
- <sup>31</sup> Undas A, Szułdrzynski K, Stepień E, Zalewski J, Godlewski J, Tracz W, Pasowicz M, Zmudka K. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2008 Feb 1;196(2):551-7.
- <sup>32</sup> Martinez M, Weisel JW, Ischiropoulos H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Dec 1;65:411-8.
- <sup>33</sup> Medeiros R, Rossi S, López E, Miraballes I, Borthagaray G. Development and application of novel ELISA-based analytical tools for assessing nitroxidative distress biomarkers in ischemic stroke: implications for improved diagnosis and clinical management. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2024 Mar 3;45(2):122-49.
- <sup>34</sup> Parastatidis I, Thomson L, Burke A, Chernysh I, Nagaswami C, Visser J, Stamer S, Liebler DC, Koliakos G, Heijnen HF, FitzGerald GA. Fibrinogen  $\beta$ -chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Dec 5;283(49):33846-53.
- <sup>35</sup> Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bennett JS, Murciano JC, Muzykantov V. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Mar 2;279(10):8820-6.
- <sup>36</sup> Medeiros R. Bioanálisis de Modificaciones Postraduccionales Nitroxidativas del Fibrinógeno Humano. Consecuencias funcionales: estudios in silico e in vitro [tesis doctoral]. Montevideo: Facultad de Química, Universidad de la República; 2024