

Estudios de fibrinoformación y fibrinolisis en plasma de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico

► Romina Antonella Medeiros Figueredo^{1a*}, José Manuel Larramendi Embid^{2a},
María Camila Gaiero Petruccelli^{3a}, Carlos José Mattos Gimenez^{4a},
María Camila Zerbino Sánchez^{5a}, Elizabeth López Achigar^{6a},
Ana Silvina Rossi Assandri^{7b}, Iris Miraballes Martínez^{8b}

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar las diferencias en la formación y lisis de fibrina entre pacientes con accidente cerebrovascular isquémico (ACVi) y controles. Se buscó comprender la dinámica de la fibrinoformación y fibrinolisis, y cómo éstas pueden estar relacionadas con el desarrollo de un ACVi. Se realizaron estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinolisis en el plasma de 41 pacientes con ACVi y de 58 controles utilizando un ensayo turbidimétrico basado en la medición de la absorbancia durante la formación y lisis del coágulo. El plasma se activó con factor tisular recombinante y calcio, y se añadió activador tisular del plasminógeno recombinante para inducir la lisis del coágulo. Se analizaron parámetros derivados de las curvas obtenidas: tiempo de coagulación (Tc), absorbancia máxima (Amax) y tiempo de fibrinolisis (Tf) y se compararon entre los diferentes grupos. Los pacientes con ACVi presentaron un Tc significativamente mayor (915 ± 102 s) comparado con los controles con factores de riesgo (CCFR) (726 ± 95 s) y sin factores de riesgo (CSFR) (674 ± 105 s). Los pacientes con ACVi mostraron una Amax superior ($0,768 \pm 0,066$ UA) en comparación con los CSFR ($0,666 \pm 0,053$ UA), con significación estadística. El Tf fue significativamente mayor en pacientes con ACVi (1621 ± 180 s) que en los CCFR (1340 ± 130 s) y CSFR (1373 ± 153 s). Estos resultados sugieren que los pacientes con ACVi tendrían una fibrinoformación más lenta y una fibrinolisis más prolongada, lo que podría contribuir a la patogénesis del ACVi.

Palabras clave: Accidente cerebrovascular isquémico; Hemostasia; Fibrinoformación; Fibrinolisis; Coagulación; Trombosis; Fibrinógeno; Fibrina; Plasma; Ensayo turbidimétrico

Studies on fibrin formation and fibrinolysis in plasma of patients with ischemic stroke

The study aimed at evaluating differences in fibrin formation and lysis between patients with ischemic stroke (IS) and controls. It sought to understand variations in the dynamics of fibrin formation and fibrinolysis and how these may be related to the development of IS. Functional studies of fibrin formation and fibrinolysis were performed in plasma from 41 IS patients

¹ Bioquímica Clínica, Doctora en Química. (ORCID: 0000-0002-5680-4054)

² Bioquímico Clínico. (ORCID: 0009-0004-0191-1620)

³ Bioquímica Clínica. (ORCID: 0009-0004-7086-2375)

⁴ Bioquímico Clínico. (ORCID: 0009-0000-3961-4278)

⁵ Bioquímica Clínica. (ORCID: 0009-0006-3606-8324)

⁶ Química Farmacéutica, Bioquímica Clínica. (ORCID: 0000-0001-7939-5794)

⁷ Magíster en Química. (ORCID: 0000-0003-3448-9329)

⁸ Química Farmacéutica, Doctora en Química. (ORCID: 0000-0001-5192-7971)

^a Unidad de Bioquímica Clínica y Hematología, Laboratorio Central Hospital Maciel, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República. 25 de Mayo 174, 11000 Montevideo, Departamento de Montevideo, Uruguay.

^b Unidad de Inmunología Clínica, Laboratorio de Biotecnología del Instituto Polo Tecnológico de Pando, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Aparicio Saravia S/N, 91000 Pando, Departamento de Canelones, Uruguay.

* Autora para correspondencia

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)
ISSN 1851-6114 (en línea)
ISSN 1852-396X (CD-ROM)



COLABIOCLI



CUBRA



FABA

and 58 controls using a turbidimetric assay based on continuous absorbance measurement during clot formation and lysis. Plasma was activated with recombinant tissue factor and calcium, and recombinant tissue plasminogen activator was added to induce clot lysis. Parameters derived from the resulting curves –coagulation time (Tc), maximum absorbance (Amax), and fibrinolysis time (Tf)– were analysed and compared among the different groups. IS patients showed a significantly longer Tc (915 ± 102 s) compared to controls with risk factors (CWRF) (726 ± 95 s) and controls without risk factors (CWORF) (674 ± 105 s). IS patients exhibited a higher Amax ($0,768 \pm 0,066$ AU) compared to CWORF ($0,666 \pm 0,053$ AU) with statistical significance. Tf was significantly longer in IS patients (1621 ± 180 s) than in CWRF (1340 ± 130 s) and CWORF (1373 ± 153 s). These results suggest that IS patients may have slower fibrin formation and prolonged fibrinolysis, which may contribute to the pathogenesis of ischemic stroke.

Keywords: Ischemic stroke; Hemostasis; Fibrinof ormation; Fibrinolysis; Coagulation; Thrombosis; Fibrinogen; Fibrin; Plasma; Turbidimetric test

Estudos de formação de fibrina e fibrinólise em plasma de pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar as diferenças na formação e lise de fibrina entre pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) e controles. Tentou-se entender a dinâmica da formação de fibrina e fibrinólise e como estas podem estar relacionadas com o desenvolvimento do AVCi. Foram realizados estudos funcionais de formação de fibrina e fibrinólise no plasma de 41 pacientes com AVCi e de 58 controles, utilizando um ensaio turbidimétrico baseado na medição contínua da absorbância durante a formação e lise do coágulo. O plasma foi ativado com fator tissular recombinante e cálcio, e foi adicionado plasminogênio tissular recombinante para induzir a lise do coágulo. Parâmetros derivados das curvas obtidas foram analisados: tempo de coagulação (Tc), absorbância máxima (Amax) e tempo de fibrinólise (Tf), sendo comparados entre os diferentes grupos. Os pacientes com AVCi apresentaram um Tc significativamente maior (915 ± 102 s) em comparação com os controles com fatores de risco (CCFR) (726 ± 95 s) e sem fatores de risco (CSFR) (674 ± 105 s). Os pacientes com AVCi apresentaram uma Amax superior ($0,768 \pm 0,066$ UA) em comparação com CSFR ($0,666 \pm 0,053$ UA), com significância estatística. O Tf foi significativamente maior em pacientes com AVCi (1621 ± 180 s) do que nos CCFR (1340 ± 130 s) e CSFR (1373 ± 153 s). Esses resultados sugerem que os pacientes com AVCi apresentam uma formação de fibrina mais lenta e uma fibrinólise mais prolongada, o que pode contribuir para a patogênese do AVCi.

Palavras-chave: Acidente vascular cerebral isquêmico; Hemostasia; Fibrinof ormation; Fibrinólise; Coagulação; Trombose; Fibrinogênio; Fibrina; Plasma; Teste turbidimétrico

Introducción

Accidente cerebrovascular isquémico

El accidente cerebrovascular isquémico (ACVi) representa el 85% de los accidentes cerebrovasculares (ACV) y se define como el desarrollo rápido de signos clínicos de disfunción neurológica debido a un infarto cerebral. Según las estadísticas sanitarias de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ACV es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad a nivel global. En 2019, 3,3 millones de personas murieron por ACVi, con una incidencia anual de 7,6 millones y una prevalencia de 77,2 millones (1). Sus secuelas generan una carga sanitaria y social significativa, con elevada morbilidad y riesgo de recurrencia.

El mecanismo del ACVi implica la interrupción del flujo sanguíneo cerebral debido a un trombo o engrosamiento del endotelio luminal, relacionado con estados de hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis o inflamación. Este proceso genera un estado de isquemia cerebral aguda (ICA) que desencadena una cascada de eventos patogénicos que incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) de la neuronas, las cuales contribuyen al daño estructural y funcional de las neuronas (2) (3).

Distrés nitroxidativo

Las células utilizan oxígeno para generar energía y producen especies reactivas, tanto radicalarias como no radicalarias, que pueden actuar como agentes oxidantes

y nitrantes. La generación de especies reactivas es un proceso fisiológico necesario para la homeostasis celular, implicado en funciones como la señalización celular, la respiración mitocondrial y la defensa inmunitaria (4) (5). Sin embargo, cuando la producción de estas especies supera la capacidad antioxidante del organismo, se genera un estado de distrés nitroxidativo que puede llevar a la disrupción de biomoléculas esenciales (6) (7). Entre las ROS más relevantes se encuentran el superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que entre las RNS se destacan el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) y el peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), este último altamente reactivo y capaz de modificar proteínas por nitración de residuos de tirosina. La presencia de $ONOO^{\bullet}$ en el entorno celular está asociada a la disrupción de la función mitocondrial, la activación de vías proapoptóticas y la oxidación de lípidos y proteínas, contribuyendo así a la muerte neuronal en el contexto del ACVi (8) (9).

Fibrinógeno y fibrina

El fibrinógeno (Fg) es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado, con una masa de aproximadamente 340 kDa y una concentración fisiológica de entre 200 y 400 mg/dL. Es esencial para la hemostasis, ya que su conversión en fibrina (Fb) por acción de la trombina permite la formación del coágulo sanguíneo (10). Se ha observado que el Fg es particularmente susceptible a modificaciones postraduccionales (PTMs), como la nitración inducida por el $ONOO^{\bullet}$, lo que afecta su estructura y función (11) (12).

La formación de la red de Fb es un proceso altamente regulado y depende de la estructura del Fg, su interacción con otros componentes plasmáticos y las condiciones del entorno. Se ha observado que los coágulos de Fb formados en condiciones de distrés nitroxidativo son más densos y menos permeables, lo que podría influir en la resistencia a la fibrinólisis y aumentar el riesgo trombótico en pacientes con ACVi (13). Además, se ha corroborado la presencia de Fg nitrado en el plasma de pacientes con ACVi (14) (15).

Hemostasis

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 (16). Consta de tres fases principales: hemostasis primaria, coagulación y fibrinólisis. En la hemostasis primaria ocurre vasoconstricción tras una lesión vascular y las plaquetas se adhieren

al sitio, tras lo cual ocurre la activación y agregación plaquetaria, formando un tapón plaquetario temporal. Luego, en la fase de la coagulación (o hemostasis secundaria) ocurre una cascada de reacciones enzimáticas, cuya activación se puede esquematizar, para su estudio, mediante dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca, que convergen en la vía común. La vía intrínseca se activa cuando factores presentes en la sangre interactúan con superficies cargadas negativamente y resulta en la activación del factor X. La vía extrínseca se inicia con la interacción entre el factor tisular (TF) expuesto en la superficie de las células dañadas y el factor VII y culmina en la activación del factor X. La vía común es la convergencia de las vías anteriores a partir del factor Xa, que interviene en la conversión de protrombina a trombina. La acción de la trombina sobre el Fg da lugar a la Fb que se polimeriza para formar una red insoluble que estabiliza el coágulo plaquetario (17). Finalmente, en la fase de retracción del coágulo y fibrinólisis las plaquetas contraen el coágulo y éste es degradado por el sistema fibrinolítico para restaurar la circulación sanguínea.

El equilibrio entre la formación y lisis del coágulo es crucial para la homeostasis vascular. Alteraciones en este equilibrio pueden llevar a estados procoagulantes o a una fibrinólisis ineficaz, aumentando el riesgo de trombosis. La fibrinólisis está regulada por diversas proteínas, entre ellas la plasmina, el activador tisular del plasminógeno (tPA) y los inhibidores de la fibrinólisis como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la α_2 -antiplasmina.

Estudios de formación y lisis del coágulo

La dinámica de formación y lisis del coágulo se puede estudiar determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo, obteniendo perfiles de turbidez (18) (19) (20). Así, se generan curvas de fibrinoformación y fibrinólisis del coágulo, de las cuales se pueden estimar parámetros como la fase *lag* (tiempo hasta la formación inicial de Fb), tiempo de coagulación [T_c , tiempo que transcurre entre que termina la fase *lag* y se llega a la absorbancia máxima (A_{max})], A_{max} (máxima concentración de Fb en la cubeta) y el tiempo de fibrinólisis completa (Tf).

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 (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP), 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.

Objetivo general

El objetivo general fue 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

Como objetivos específicos se planteó evaluar y comparar los parámetros Tc, Amax, Tf y la relación Tf/Tc durante la formación del coágulo entre pacientes con ACVi y los grupos de control, con y sin factores de riesgo (FR), para determinar si existen diferencias significativas en la dinámica de la fibrinoformación y la fibrinólisis.

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. Se excluyeron los pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento anticoagulante.

Además, se recolectó una muestra de sangre, información demográfica e historial familiar y personal de enfermedades cardiovasculares (ECV) 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 fibrinólisis

Se realizaron estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinólisis en pacientes con ACVi y controles. Mediante el equipo Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlandia) y el protocolo descrito por Larsen & Hvas (21) se realizaron estudios para evaluar

de manera consecutiva 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. Brevemente, en una placa de 96 pocillos (Nunc ImmunoPlate, Thermo Fisher Scientific, Cat. N° 442404) se agregaron 70 µL de plasma citratado pobre en plaquetas (sangre recogida en tubo con citrato de sodio 0,109 M en relación 9:1, centrifugada a 3000 g por 25 minutos), 30 µL de TF recombinante con fosfolípidos y Ca^{2+} (RecombiPlasTin 2G, HemosIL, 0020002950) para inducir la formación de Fb, 20 µL de tPA recombinante (0,001 mg/mL, alteplasa, Actilyse®, Boehringer Ingelheim) para inducir la lisis y 30 µL de *buffer* HEPES-Ca (20 mM HEPES [ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico], 150 mM NaCl, 200 mM CaCl_2 , pH 7,4). Se empleó un principio turbidimétrico dado que la red de Fb primero se forma y luego se lisa en la cubeta, con lo cual la turbidez aumenta y luego disminuye. Se registró la absorbancia a 405 nm continuamente durante 1,5 horas para generar curvas de formación-lisis del coágulo que muestran la absorbancia en unidades de absorbancia (UA) medida en función del tiempo en segundos, las cuales se analizaron posteriormente.

Para cada muestra se obtuvo una curva de fibrinoformación y fibrinólisis (por duplicado) y de éstas se extrajeron los siguientes parámetros: Amax, Tc (definido como el tiempo desde que comienza la fibrinoformación, cuando la derivada cambia de 0 a un valor positivo, hasta el tiempo de Amax), Tf [definido como el tiempo a partir de Amax hasta que termina la fibrinólisis (cuando la derivada cambia de un valor negativo a 0)] y la relación entre éstos (Tf/Tc). La derivada se calculó como la variación entre puntos consecutivos de absorbancia (y) respecto al tiempo (x), utilizando la fórmula $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$. Además, se realizó un estudio de correlación entre la Amax en UA y la concentración de Fg de la muestra, determinada con el método de Clauss, en mg/dL y se obtuvo un valor de R^2 . El fibrinógeno fue determinado en un analizador de hemostasis automatizado: ACL TOP 500 CTS (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) con el *kit* Fibrinogen-C (HemosIL, 0220301100).

Se realizaron los estudios funcionales de fibrinoformación y fibrinólisis en 41 muestras de plasma de pacientes con ACVi y en 58 muestras de plasma de controles sin ACVi ni antecedentes de ACVi. Dentro de los controles sin ACVi, se estudiaron 22 muestras de plasma de pacientes sin FR para desarrollar un ACVi (CSFR) (HTA, DM, dislipemia, consumo de tabaco o antecedente de ECV) y 36 de controles de población general con algún factor de riesgo (CCFR), en duplicado. Se compararon los resultados entre grupos mediante el *test* de hipótesis *t*-Student para dos muestras independientes, y se realizó análisis de regresión lineal para evaluar la influencia de la concentración de Fg, utilizando en ambos casos un nivel de significación de 0,05.

Resultados

En cuanto a la epidemiología de los grupos clínicos estudiados, el grupo CSFR presentó una media $\pm$ IC95% de edad de $49,4 \pm 8,4$ años; de los 22 individuos 10 eran mujeres y 12 eran hombres y no presentaban FR cardiovasculares. El grupo CCFR presentó una media de edad de $63,9 \pm 3,6$ años; de los 36 individuos 16 eran mujeres y 20 eran hombres; y en cuanto a los FR se observaron 21 casos de HTA, 10 casos de DM, 10 casos de tabaquismo, 7 casos de dislipemia y un antecedente de ECV. El grupo ACVi presentó una media de edad de $67,1 \pm 4,5$ años; de los 41 individuos 18 eran mujeres y 23 eran hombres; y en cuanto a FR, se observaron 32 casos de HTA, 13 de DM, 22 de tabaquismo, 18 de dislipemia y 20 casos con antecedente de ECV.

Se evaluó la formación y lisis del coágulo *ex vivo* y se obtuvieron curvas de fibrinoformación y fibrinólisis que permitieron visualizar el comportamiento de la formación y lisis del coágulo de cada muestra. La Figura 1 muestra las curvas obtenidas en una de las corridas realizadas.

Las curvas de fibrinoformación y fibrinólisis exhiben el perfil esperado, caracterizado por una fase inicial de latencia (fase *lag*), seguida de una pendiente ascendente pronunciada que refleja el inicio y la progresión de la formación del coágulo. Posteriormente se alcanza un máximo de absorbancia, correspondiente a la estabilización del coágulo formado. Finalmente, la curva muestra una pendiente descendente que representa la fibrinólisis, la cual disminuye en valor absoluto gradualmente hasta completarse.

En el presente trabajo se hizo foco en Tc, en la Amax y en el Tf. Los resultados se expresaron como media con intervalo de confianza 95% (IC95%) y coeficiente de variación del grupo (CV).

En cuanto a los Tc, se observó una media $\pm$ IC95% (CV) de 674 ± 105 s (37%) para los CSFR, 726 ± 95 s (40%) para los CCFR y 915 ± 102 s (37%) para los ACVi. El test estadístico realizado comparando los Tc de los grupos CSFR y CCFR arrojó un *p* de 0,47. Comparando los Tc del grupo CCFR y ACVi se obtuvo un *p* de 0,01. Entre los grupos CSFR y ACVi el *p* fue de 0,002. El valor del Tc fue mayor en el grupo ACVi comparando con ambos grupos control, con significación estadística (Fig. 2).

En cuanto a la Amax obtenida para cada grupo, el grupo CSFR presentó una media $\pm$ IC95% (CV) de $0,666 \pm 0,053$ UA (19%), el grupo CCFR de $0,674 \pm 0,070$ UA (32%) y el grupo ACVi de $0,768 \pm 0,066$ UA (28%). El análisis estadístico arrojó un *p* de 0,86 al comparar los grupos CSFR y CCFR, un *p* de 0,06 al comparar los grupos CCFR y ACVi y un *p* de 0,02 al comparar los grupos CSFR y ACVi. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ACVi y CSFR y se obtuvo un resultado inconcluyente en cuanto a la presencia de diferencias significativas entre los grupos CCFR y ACVi (Fig. 3). Además, se observó que los valores de Amax eran más homogéneos en el grupo CSFR que en los otros dos grupos.

Las medias $\pm$ IC95% (CV) de los valores de Fg determinados con el método de Clauss (valor de referencia: 200-400 mg/dL) fueron de $316,7 \pm 24,9$ mg/dL (19%) en el grupo CSFR (valores normales), $407,8 \pm 47,2$ mg/dL (36%) en el grupo CCFR (valores ligeramente aumen-

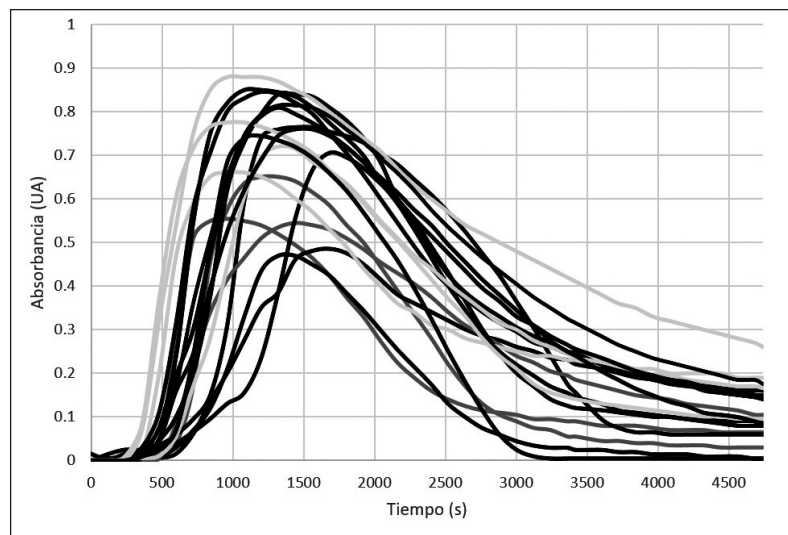


Figura 1. Curvas obtenidas de fibrinoformación y fibrinólisis de coágulo

Se observan todas las curvas obtenidas en una corrida como ejemplo. Controles sin factores de riesgo (CSFR): gris claro. Controles con factores de riesgo (CCFR): gris oscuro. ACVi: negro.

Se puede ver una forma similar para los tres grupos clínicos estudiados.

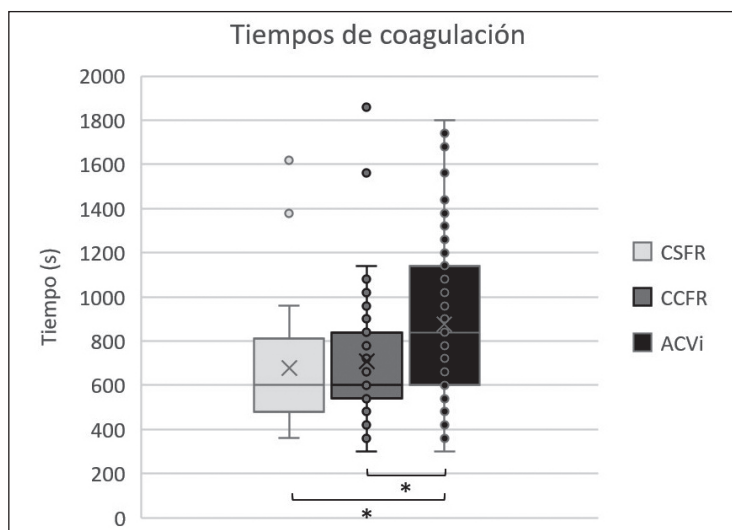


Figura 2. Distribución de tiempos de coagulación en cada grupo clínico estudiado

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. Resultados del análisis estadístico: CCFR y CSFR: $p=0,41$. CCFR y ACVi: $p=0,01$. CSFR y ACVi: $p=0,002$. Existe diferencia significativa en los Tc del grupo ACVi y los de los grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: gris claro. CCFR: gris oscuro. ACVi: negro. El asterisco indica un $p<0,05$.

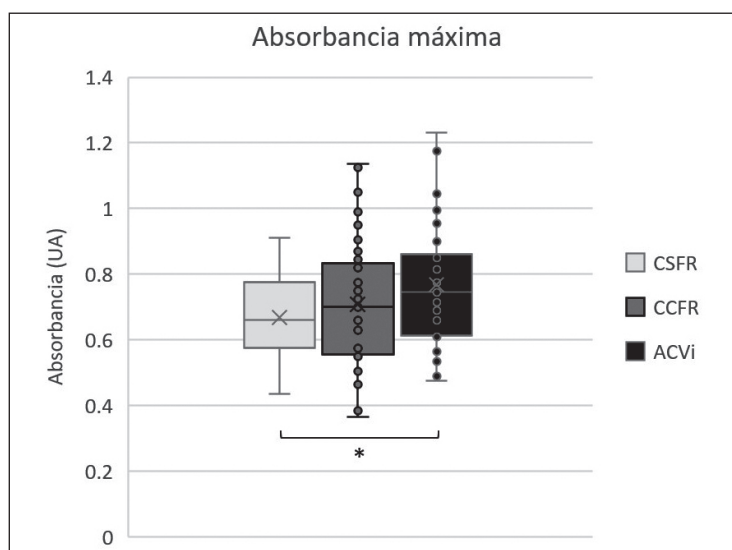


Figura 3. Distribución de absorbancias máximas en cada grupo clínico estudiado

Distribución de alturas de pico para cada grupo. Resultados del análisis estadístico: CCFR y CSFR: $p=0,86$. CSFR y ACVi: $p=0,02$. CCFR y ACVi: $p=0,06$. Existe diferencia significativa entre el grupo ACVi y el grupo CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: gris claro. CCFR: gris oscuro. ACVi: negro. El asterisco indica un $p<0,05$.

tados) y $576,1 \pm 46,5$ mg/dL (26%) en el grupo ACVi (valores aumentados). En cuanto al análisis estadístico, se demostró la existencia de diferencia significativa en las medias de los valores de Fg entre todos los grupos ($p=0,001$ entre CSFR y CCFR, $p=1 \times 10^{-13}$ entre CSFR y ACVi y $p=4 \times 10^{-6}$ entre CCFR y ACVi). Aquí también se observó que los valores de Fg eran más homogéneos en el grupo CSFR que en los otros dos grupos.

También se estudió la relación entre la Amax obtenida y la concentración de Fg medida mediante el método de Clauss y se observó una tendencia hacia una correlación lineal, con un R^2 de 0,55 (Fig. 4).

Comparando los Tf (duración de la lisis) se observó una media $\pm$ IC95% (CV) de 1373 ± 153 s (27%) para los CSFR, de 1340 ± 130 s (30%) para los CCFR y de 1621 ± 180 s (36%) para el grupo ACVi. El análisis esta-

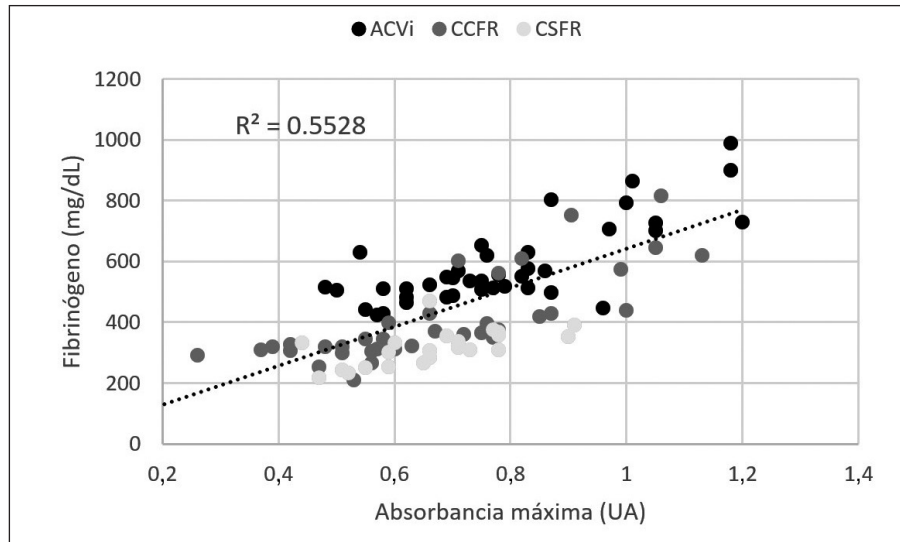


Figura 4. Correlación de la absorbancia máxima con la concentración de fibrinógeno en cada individuo estudiado

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 punteada negra. CSFR: gris claro. CCFR: gris oscuro. ACVi: negro.

dístico arrojó un p de 0,75 al comparar los Tf entre los grupos CSFR y CCFR, un valor p de 0,02 al comparar los Tf entre CCFR y ACVi, y un valor de p de 0,04 entre CSFR y ACVi. El grupo ACVi presentó un valor medio mayor que los otros dos grupos, con diferencia estadísticamente significativa (Fig. 5).

Finalmente, al analizar las relaciones Tf/Tc, se obtuvieron valores de media $\pm$ IC95% (CV) de $2,26 \pm$

$0,36$ (38%) para el grupo CSFR, de $2,13 \pm 0,31$ (45%) para el grupo CCFR y de $1,88 \pm 0,19$ (34%) para el grupo ACVi, sin haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,58$ entre CSFR y CCFR, $p=0,08$ entre CSFR y ACVi y $p=0,20$ entre CCFR y ACVi).

Para evaluar el impacto de la concentración de Fg en los parámetros analizados se realizó un análisis de

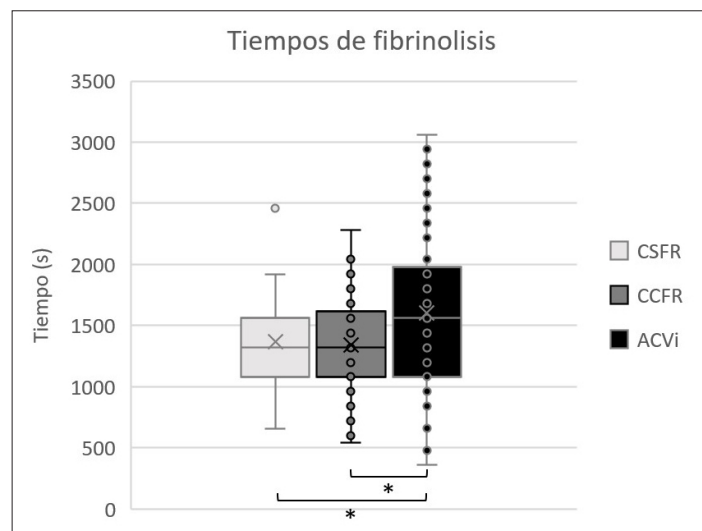


Figura 5. Distribución de tiempos de fibrinólisis en cada grupo clínico estudiado

Distribución de tiempos de lisis para cada grupo. Se toma como tiempo de lisis desde el tiempo del pico (donde comienza la lisis) hasta el tiempo final. Resultados del análisis estadístico: CCFR y CSFR: $p=0,75$. CCFR y ACVi: $p=0,02$. CSFR y ACVi: $p=0,04$. Existe una diferencia significativa entre el grupo ACVi y los grupos CCFR y CSFR, observándose valores más elevados para ACVi. CSFR: gris claro. CCFR: gris oscuro. ACVi: negro. El asterisco indica $p<0,05$.

regresión por grupo. En los grupos CSFR y ACVi, al graficar Tc, Tf y Tf/Tc en función de la concentración de Fg, las pendientes de las líneas de tendencia obtenidas no fueron significativamente diferentes de cero ($p>0,05$), lo que sugiere que la concentración de Fg no influye significativamente en estos parámetros y, por lo tanto, no es necesario realizar un ajuste. No obstante, en ambos grupos se observó una asociación estadísticamente significativa entre Amax y la concentración de Fg, lo que justificó un ajuste posterior de este parámetro para el análisis comparativo entre grupos.

En el grupo CCFR, el análisis mostró que Tf y Tf/Tc tampoco presentaban una relación significativa con Fg ($p>0,05$). Sin embargo, tanto Tc como Amax sí mostraron una asociación estadísticamente significativa con la concentración de Fg, por lo que se ajustaron estos valores antes del reanálisis comparativo.

Tras aplicar los ajustes correspondientes, se realizaron nuevas comparaciones entre los grupos utilizando la prueba *t*-Student. Como resultado, se observaron algunos cambios respecto al análisis previo. En primer lugar, al ajustar Tc en el grupo CCFR, se identificó una diferencia significativa entre los grupos CSFR y CCFR, la cual no se había evidenciado antes del ajuste. Se mantuvieron las diferencias previamente observadas entre los grupos CCFR y ACVi, así como entre CSFR y ACVi.

En cuanto a Amax, tras el ajuste en todos los grupos, se encontró que, mientras que previamente solo se había identificado una diferencia significativa entre los grupos ACVi y CSFR, el análisis ajustado reveló diferencias significativas en Amax entre los tres grupos. En síntesis, el ajuste por concentración de Fg no eliminó las diferencias significativas observadas previamente, sino que permitió identificar nuevas diferencias entre los grupos, brindando un análisis más preciso de los datos.

Discusión y Conclusiones

Se obtuvieron curvas de fibrinoformación y fibrinolisis que permiten visualizar la tendencia de la formación y lisis de un coágulo. En los parámetros Tf y Tf/Tc, los análisis estadísticos realizados para comparar los grupos control CSFR y CCFR no arrojaron evidencia de diferencias significativas. No así para los parámetros Tc y Amax, que tras su ajuste por concentración de Fg, mostraron diferencias entre los grupos CSFR y CCFR. Cuando se compararon el Tc y el Tf del grupo ACVi con ambos grupos control se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con ambos tiempos mayores en el grupo ACVi. Estos hallazgos apuntan a que los Tf serían mayores en los pacientes con ACVi, es decir que la lisis del coágulo ocurriría de forma más lenta, indicando una capacidad fibrinolítica disminuida, lo cual es un factor protrombótico que podría estar favoreciendo el desarrollo o perpetuando el evento de ACVi (1). También los

Tc serían mayores en ACVi, es decir que el tiempo que transcurre entre que comienza a formarse el coágulo y éste alcanza su máxima turbidez es mayor.

Otro hallazgo es que la Amax de las curvas es mayor en el grupo ACVi, comparando con el grupo CSFR, con evidencia estadística. En la bibliografía se plantea que la Amax podría estar relacionada a la cantidad de Fg de la muestra y que una Amax aumentada puede ser causada por un incremento en la concentración de Fg plasmático. En este caso las muestras del grupo ACVi presentaban valores de Fg elevados, mientras que el grupo CSFR presentó valores de Fg normales (22). Cuando se realizó el análisis de regresión se observó que efectivamente la concentración de Fg influía en el valor de Amax con significación estadística.

Cuando se estudió la correlación entre la Amax y la concentración de Fg determinada por el método de Clauss, se observó una correlación positiva en todos los grupos estudiados, con un R^2 de 0,55. Este R^2 indica que, si bien la concentración de Fg está influyendo, puede haber otras variables que también influyen en el valor de Amax obtenida, por ejemplo, la arquitectura de la red de Fb formada.

Estos resultados pueden interpretarse como que en los pacientes ACVi el coágulo se forma durante más tiempo, alcanzando una Amax consistente con la cantidad de Fg que contienen y con la calidad de la Fb formada, y luego tarda más tiempo en ser degradado por el sistema fibrinolítico. Aquí cabe aclarar que una limitación de este estudio es que no se determinó la concentración de componentes de ese sistema (como PAI-1, plasminógeno o tPA) de manera previa al estudio, por lo cual se desconoce si estos elementos, que podían estar alterados en algunos pacientes, podrían estar actuando como variables confusoras.

Se han realizado estudios de formación y lisis de coágulo 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 (23) (24). También se observó este aumento del Tf en DM, disfunción hepática y sepsis (25) (26) (27). En el caso de coágulos de pacientes ACVi, Undas *et al.* (28) realizaron además estudios de permeación y microscopía electrónica y encontraron que éstos presentaban una red menos porosa y por tanto menos susceptible a fibrinolisis, más compacta, con una mayor masa de coágulo y con fibras más gruesas. En otro trabajo se describieron propiedades alteradas de coágulos de pacientes con síndrome coronario agudo, como más resistentes a la fibrinolisis, y correlacionaron estas características con el 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 (29) (30).

Con la premisa de que el Fg de los pacientes con ACVi estaría nitrado, apoyada por los resultados obtenidos en

este grupo de investigación (14) (31), resulta interesante preguntarse cómo afectaría esta modificación a la fibrinoformación y fibrinólisis y si esto es algo que se está observando. Se han realizado estudios funcionales y de imagen en coágulos que contenían Fg nitrado *in vivo* e *in vitro* y se han encontrado cambios en la cinética, arquitectura, rigidez y fibrinólisis. Parastatidis *et al.* (32) observaron un aumento en la absorbancia y turbidez final en muestras que contenían Fg nitrado, un aumento en la velocidad inicial de formación del coágulo, lo cual asociaron a una aceleración de la agregación lateral, y un aumento en la firmeza del coágulo, lo cual se asociaría a una disminución en la tasa de fibrinólisis. Sus hallazgos apuntan a una consecuencia funcional de la nitración del Fg, hacia una ganancia de función de éste (coagulación más rápida, coágulo más denso). Esos hallazgos concuerdan en parte con lo observado por Vadseth *et al.* (33) quienes, 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 entre este trabajo y el anteriormente mencionado, es que no se observó alteración en la lisis.

Otro estudio interesante a comentar es el realizado por Ill-Raga *et al.* (13) quienes mediante tromboelastometría analizaron trombos formados en condiciones nitroxidativas 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 pudieron deberse a una nitración global de proteínas y factores de la cascada de la coagulación y la fibrinólisis. Los autores plantearon que la nitración de Fg enlentece la formación del coágulo, a la vez que lo hace más resistente a la 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 una 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 estrés 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 observado por Ill-Raga *et al.* (13). 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 mediante microscopía electrónica y la determinación de nitración en el mismo con estudios inmunoquímicos.

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 publicaciones que indican una alteración en las características funcionales observables de estos coágulos, que se atribuyen a cambios estructurales, sin explicar la causa de esos cambios. Anteriormente, en este grupo de investigación se generó evidencia de la existencia de nitroxidación en el Fg y plasma de pacientes con ACVi (14) (31). También se encontró nitroxidación de 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 afectaba la estructura regional de la molécula de Fg y alteraba potencialmente la funcionalidad (34).

Resulta interesante observar las alteraciones funcionales del coágulo, pues se evidencian clínicamente como una situación protrombótica debido a hipercoagulabilidad o a hipofibrinólisis, o a una hemorragia debida 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 una situación de inflamación y distrés nitroxidativo.

Fuentes de financiación

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Química (FQ) Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) – UdelaR. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas – Química (PEDECIBA QUÍMICA).

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. ROMINA ANTONELLA MEDEIROS FIGUEREDO
Laboratorio Central Hospital Maciel, 25 de Mayo 174, 11000
Montevideo, Departamento de Montevideo, Uruguay.
Correo electrónico: rmedeiros@fq.edu.uy

Referencias Bibliográficas

1. Feigin VL, Stark BA, Johnson CO, Roth GA, Bisignano C, Abady GG, *et al.* Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 2021 Oct; 20 (10): 795-820.
2. Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci* 2011 Oct; 12 (10): 7199-215.
3. Jelinek M, Jurajda M, Duris K. Oxidative stress in the brain: basic concepts and treatment strategies in stroke. *Antioxidants* 2021 Nov; 10 (12): 1886.

4. Sies H, Mailloux RJ, Jakob U. Fundamentals of redox regulation in biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024 Apr; 30: 1-9.
5. Sies H. Oxidative eustress and oxidative distress: introductory remarks. In: *Oxidative stress*. Londres: Academic Press; 2020.
6. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015 Apr; 4: 180-3.
7. Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids* 2011; 2011 (1): 207691.
8. Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 2013 Apr; 51 (2): 97-106.
9. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007 Jan; 87 (1): 315-424.
10. Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. *J Vasc Interv Radiol* 2001 Jun; 12 (6): 677-82.
11. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 1994 Nov; 17 (5): 429-37.
12. Salman-Tabcheh S, Guérin MC, Torrelles J. Nitration of tyrosyl-residues from extra-and intracellular proteins in human whole blood. *Free Radic Biol Med* 1995 Nov; 19 (5): 695-8.
13. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005 Aug; 3 (8): 1894-904.
14. Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernández E, Guix FX, Bosch-Morató M, Guivernau B, *et al.* Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death. *Biochim Biophys Acta* 2015 Mar; 1852 (3): 421-8.
15. Medeiros R, Sousa B, Rossi S, Afonso C, Bonino L, Pitt A, *et al.* 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 Radic Biol Med* 2021 Mar; 165: 334-47.
16. Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *J Thromb Haemost* 2023 Nov; 21 (11): 3005-15.
17. Du J, Wang J, Xu T, Yao H, Yu L, Huang D. Hemostasis strategies and recent advances in nanomaterials for hemostasis. *Molecules* 2023 Jul; 28 (13): 5264.
18. Blombäck B, Okada M. Fibrin gel structure and clotting time. *Thromb Res* 1982 Jan; 25 (1-2): 51-70.
19. Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Åslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989 Jul; 997 (1-2): 96-110.
20. Beebe DP, Aronson DL. An automated fibrinolytic assay performed in microtiter plates. *Thromb Res* 1987 Jul; 47 (1): 123-8.
21. Larsen JB, Hvas AM. Fibrin clot formation and lysis in plasma. *Methods Protoc* 2020 Sep; 3 (4): 67.
22. Neergaard-Petersen S, Mogensen VB, Veirup MS, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Fibrin clot lysis assay: establishment of a reference interval. *Thromb Res* 2018 Jul; 167: 9-11.
23. Lisman T, De Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005 Feb; 105 (3): 1102-5.
24. Ząbczyk M, Natorska J, Janion-Sadowska A, Metzger-Gumiela A, Polak M, Plens K, *et al.* Prothrombotic fibrin clot properties associated with NETs formation characterize acute pulmonary embolism patients with higher mortality risk. *Sci Rep* 2020 Jul; 10 (1): 11433.
25. Neergaard-Petersen S, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL, Larsen SB, Phoenix F, *et al.* The influence of type 2 diabetes on fibrin clot properties in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2014; 112 (12): 1142-50.
26. Bos S, van den Boom B, Kamphuisen PW, Adelmeijer J, Blokzijl H, Schreuder T, *et al.* Haemostatic profiles are similar across all aetiologies of cirrhosis. *Thromb Haemost* 2019 Feb; 119 (02): 246-53.
27. Semeraro F, Colucci M, Caironi P, Masson S, Ammollo CT, Teli R, *et al.* Platelet drop and fibrinolytic shutdown in patients with sepsis. *Crit Care Med* 2018 Mar; 46 (3): e221-8.
28. Undas A, Slowik A, Wolkow P, Szczudlik A, Tracz W. Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: relation to neurological deficit. *Thromb Res* 2010 Apr; 125 (4): 357-61.
29. Undas A, Szułdrzynski K, Stepień E, Zalewski J, Godlewski J, Tracz W, *et al.* Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis* 2008 Feb; 196 (2): 551-7.
30. Martinez M, Weisel JW, Ischiropoulos H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radic Biol Med* 2013 Dec; 65: 411-8.
31. Medeiros R, Rossi S, López E, Miraballes I, Borthagaray G. Development and application of novel ELISA-based analytical tools for assessing nitrooxidative distress biomarkers in ischemic stroke: implications for improved diagnosis and clinical management. *J Immunoassay Immunochem* 2024 Mar; 45 (2): 122-49.
32. Parastatidis I, Thomson L, Burke A, Chernysh I, Nagaswami C, Visser J, *et al.* Fibrinogen β -chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *J Biol Chem* 2008 Dec; 283 (49): 33846-53.
33. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, *et al.* Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004 Mar; 279 (10): 8820-6.
34. Medeiros R. Bioanálisis de modificaciones postraduccionales nitrooxidativas del fibrinógeno humano. Consecuencias funcionales: estudios *in silico* e *in vitro* [Tesis Doctoral. Facultad de Química. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay]; 2024.

Recibido: 9 de enero de 2025

Aceptado: 25 de febrero de 2025