

# TROMBOLISIS CON EL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINOGENO

Disertación expuesta en el 8º Congreso Latino-Americano de Hemostasis y Trombosis, setiembre de 1983, en Montevideo, Uruguay, por M. Verstraete. También en el Centro de Trombosis e Investigación Vascular, Universidad de Louaina, Bélgica, por D. Collen

La molécula clave de la fibrinólisis es la plasmina, enzima que resulta de la proteólisis limitada del plasminógeno (hidrólisis del enlace Arg 560-Val 561). Tal y como se ilustra en la Figura 1, existen tres vías para la activación del plasminógeno: en la vía *intrínseca* o humoral todos los componentes se hallan en forma de precursores en la sangre; en la vía *extrínseca* el activador es liberado a la sangre a partir de los tejidos o la pared vascular donde se forma; finalmente, existe una vía *exógena* en la cual las sustancias activadoras estreptocinasas y urocinasa pueden ser infundidas para fines terapéuticos. Existen inhibidores para la mayoría de los activadores de cada vía. (3, 4)

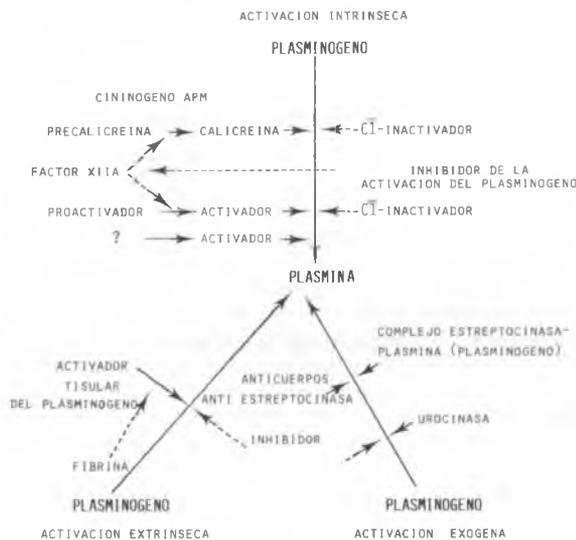


Fig. 1  
 — ACTIVACION  
 - - - INHIBICION  
 ···· COFACTOR

## 1. Regulación y control de la fibrinólisis

La regulación y control de la fibrinólisis se da a distintos niveles: liberación de activador del plasminógeno a partir de la pared vascular, activación del plasminógeno asociada a la fibrina, e inhibición de la plasmina formada por la  $\alpha_2$ -antiplasmina.

1.1. *Liberación de activador del plasminógeno:* Los mecanismos que controlan la liberación del activador del plasminógeno a partir de las células endoteliales son poco conocidos. La región neurohipofisaria podría liberar una hormona que estimularía la liberación de activador del plasminógeno por las células endoteliales; la

estructura de esta sustancia sería similar a la vasopresina. (2) Además, sólo en situaciones de fuerte stress las catecolaminas podrían inducir la liberación del activador del plasminógeno. (2)

La observación que la trombosis venosa se asocia frecuentemente con una actividad fibrinolítica disminuida ha estimulado el interés en drogas que aumenten la síntesis y liberación de activador del plasminógeno por la pared vascular.

1.2. *El segundo nivel en la regulación de la fibrinólisis* son las interacciones moleculares específicas entre el activador tisular del plasminógeno y la fibrina, entre plasminógeno y fibrina y entre plasmina y  $\alpha_2$ -antiplasmina. (4, 27)

El activador tisular del plasminógeno posee una débil afinidad por el plasminógeno en ausencia de fibrina ( $K_m = 65 \mu M$ ), pero una afinidad muy superior en presencia de fibrina ( $K_m$  entre 0,15 y 1,5  $\mu M$ ). Esta mayor afinidad es el resultado de una "asociación en superficie" del activador del plasminógeno y el plasminógeno sobre la superficie de fibrina. En esta reacción el plasminógeno se une a la fibrina vía estructuras específicas denominadas "lysine-binding site" (centros de unión de la lisina). Así, un mecanismo de regulación de la fibrinólisis existe a nivel de la activación del plasminógeno localizada en la superficie de la fibrina.

1.3. *El tercer nivel en la regulación de la fibrinólisis es la inactivación de la plasmina.* La plasmina es inactivada por la  $\alpha_2$ -antiplasmina de un modo extremadamente rápido. No obstante, la plasmina con un centro de unión a lisina ocupado es inactivada 50 veces más lentamente por la  $\alpha_2$ -antiplasmina. El bloqueo reversible con sustrato del centro activo de la plasmina también reduce considerablemente la velocidad de inactivación por la  $\alpha_2$ -antiplasmina. A partir de ello puede extrapolarse que las moléculas de plasmina generadas sobre la superficie de fibrina, unidas a la misma por medio de los centros de unión a lisina e implicadas en la degradación de la fibrina, quedan protegidas de una rápida inactivación por la  $\alpha_2$ -antiplasmina. La plasmina liberada de la superficie de fibrina sería, no obstante, rápidamente inactivada por la  $\alpha_2$ -antiplasmina.

2. Los agentes trombolíticos actualmente disponibles, la estreptocinasa y la urocinasa, no poseen una afinidad específica por la fibrina, por lo que activan relativa e indiscriminadamente tanto al plasminógeno circulante como al unido a la fibrina. (25) En consecuencia, la plasmina formada en la sangre circulante será neutralizada rápidamente por la  $\alpha_2$ -antiplasmina y perdida para la trombolisis. Una vez que el inhibidor se ha agotado, la plasmina residual degradará diversas proteínas plasmáticas (fibrinógeno, factor V, factor VIII, etc.), pudiendo causar hemorragias. A partir de ello se deduce que una trombolisis específica sólo es posible si el proceso de activación del plasminógeno puede localizarse y limitarse a la superficie de fibrina. El activador vascular o tisular del plasminógeno se adsorbe a la superficie de fibrina y activa al plasminógeno "in loco". (9)

2.1. El activador tisular se ha aislado a partir de diversos

tejidos (útero humano, ovarios porcinos, corazón porcino, etc.). No obstante, el rendimiento de estos procedimientos es extremadamente bajo (para obtener 1 mg de activador puro son necesarios 5 kg de útero humano), lo que hace prácticamente imposible pensar en una aplicación terapéutica de tales sustancias.<sup>(10, 20)</sup>

Una línea celular estable, derivada de un melanoma humano, produce grandes cantidades de un activador del plasminógeno que nuestro grupo ha encontrado ser muy similar sino idéntico al activador fisiológico del plasminógeno.<sup>(21)</sup> Nosotros hemos desarrollado un procedimiento de purificación relativamente simple y de gran rendimiento, el cual nos ha permitido producir, a nivel de laboratorio, cantidades significantes de activador tisular del plasminógeno.

**2.2. Caracterización del activador tisular del plasminógeno.** El activador del plasminógeno aislado a partir del medio de cultivo de células de melanoma humano se trata de una protenina de una sola cadena, de 70.000 daltons, la cual es indistinguible del activador del plasminógeno aislado a partir de útero humano en base a peso molecular, composición de aminoácidos, propiedades cinéticas frente a sustratos sintéticos y propiedades inmunológicas.<sup>(20)</sup>

La fibrina aumenta la velocidad de activación del plasminógeno por el activador tisular del mismo al aumentar la afinidad del plasminógeno por el activador unido a la fibrina y no por influenciar la eficiencia catalítica de la enzima.

En sistema "in vitro" compuesta por mezcla de los componentes purificados, así como en plasma total, este activador demostró poseer una actividad fibrinolítica específica muy superior a la de la urocinasa. Particularmente se demostró capaz de disolver específicamente coágulos sanguíneos suspendidos en un sistema de plasma circulante, sin causar ningún perjuicio en el sistema de la coagulación del plasma; ello resultó imposible con la urocinasa.<sup>(15)</sup> Esto se explicaría por la hipótesis de que el activador tisular del plasminógeno activa específicamente al plasminógeno unido a la fibrina y que la plasmina formada "in loco" queda protegida de la inactivación por la  $\alpha_2$ -antiplasmina. Por el contrario, la urocinasa activaría tanto al plasminógeno unido en superficie como en fase líquida de un modo relativamente indiscriminado. La plasmina formada en solución, no obstante, sería rápidamente inactivada por la  $\alpha_2$ -antiplasmina.

El efecto trombolítico relativo del activador tisular del plasminógeno y la urocinasa también fue investigado en un sistema circulante compuesto de un coágulo de sangre total marcado radioactivamente y plasma circulante al cual se infundía lentamente el activador. Este sistema permite el estudio simultáneo de los efectos trombolítico y fibrinogenolítico del activador del plasminógeno. El efecto trombolítico superior del activador tisular fue confirmado con este sistema. Además, el activador tisular causaba una activación extensiva del plasminógeno, consumo de  $\alpha_2$ -antiplasmina y degradación del fibrinógeno muy inferiores a la urocinasa necesaria para obtener un nivel comparable de trombolisis. El efecto trombolítico del activador tisular persiste durante varias horas una vez finalizada la infusión, mientras que el efecto de la urocinasa disminuye gradualmente. El activador tisular lisa coágulos de fibrina no estabilizada más extensivamente (75-100% en 5 horas) que los coágulos de fibrina totalmente estabilizada (50-60%). El grado de lisis de coágulos de 1 ó 24 horas resultó ser virtualmente el mismo. No se encontró ninguna diferencia en la velocidad de lisis del activador tisular de una o dos cadenas.<sup>(22)</sup>

El sistema sanguíneo humano es más susceptible a la lisis por el activador tisular humano que el plasma de gato o conejo. El plasma de perro es aun menos susceptible y el de ratón es el menos susceptible al activador tisular humano del plasminógeno.<sup>(11)</sup>

**2.3.** Nuestros estudios sobre la inhibición del activador tisular del plasminógeno en plasma humano revelaron que es lentamente inhibidor por la  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $t_{1/2}$  = 60 min) y por la  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $t_{1/2}$   $\approx$  120 min).<sup>(23, 24)</sup>

Después de una inyección intravenosa en conejos de una mezcla de activador tisular del plasminógeno marcado con <sup>125</sup>I y sin marcar, la actividad del activador desaparece con un  $t_{1/2}$  de 2 min. Ello no se debe a una inhibición sino a su catabolismo por el hígado.

**2.4. Propiedades trombolíticas del activador tisular del plasminógeno en animales.** El efecto trombolítico del activador tisular humano ha sido estudiado por nuestro grupo en tres modelos experimentales: émbolos pulmonares experimentales en conejos; trombosis venosa femoral en perros; y trombosis venosa yugular en conejos. El estudio del efecto trombolítico del activador tisular del plasminógeno sobre émbolos pulmonares experimentales en conejos mostró que, en base molar, el activador tisular del plasminógeno produce un efecto trombolítico más de 10 veces superior al de la urocinasa, y que puede conseguirse trombolisis sin activación sistémica de la fibrinólisis ni perjuicio del sistema hemostático.<sup>(16)</sup>

El efecto trombolítico del activador tisular del plasminógeno se investigó en perros a los que se provocó una trombosis venosa experimental en conejos.<sup>(5)</sup>

El grado de trombolisis y el balance de recuperación isotópica se muestran en las Tablas I y II. En los grupos control tratados con solvente (sistémica y/o localmente), el grado promedio de trombolisis fue  $5.6 \pm 1.4\%$  ( $n = 5$ ) después de 6 horas,  $14.7 \pm 1.7\%$  ( $n = 10$ ) después de 30,  $16.6 \pm 1.5\%$  ( $n = 11$ ) después de 78, y  $44.5 \pm 2.7\%$  ( $n = 10$ ) después de 174. No se observó aumento del coágulo en los experimentos con coágulos recientes, pero ello ocurrió en dos experimentos con coágulos de 78 horas de edad. La experiencia enseña que esto se puede prevenir mediante una inyección subcutánea de heparina. Por lo tanto, todos los experimentos con coágulos

TABLA I

Trombosis venosa experimental en conejos			
Trombolisis 2 horas después de finalizada una infusión sistémica durante 4 horas de:			
Edad del trombo	Suero fisiológico	Activador tisular del plasminógeno (100.000 UI o 1 mg)	Urocinasa 500.000 UI
6 horas	5,6 % (N 5)	76 % (N 8)	44 % (N 4)
1 día	14,7 % (N 10)	44 % (N 8)	33 % (N 4)
3 días	16,6 % (N 11)	40 % (N 8)	37 % (N 4)
7 días	44,5 % (N 10)	74 % (N 4)	48 % (N 2)

TABLA II

Trombosis venosa experimental en conejos			
Trombolisis 2 horas después de finalizada una infusión local durante 4 horas de:			
Edad del trombo	Suero fisiológico	Activador tisular del plasminógeno 20.000 UI	Urocinasa 100.000 UI
1 día	14 % (N 6)	68 % (N 8)	31 % (N 5)
3 días	19 % (N 4)	60 % (N 8)	32 % (N 4)
7 días	55 % (N 4)	77 % (N 4)	58 % (N 4)

La infusión sistémica de 100.000 IU de activador del plasminógeno, de una o dos cadenas, en conejos con coágulos envejecidos durante 1 ó 3 días originó 44 % de trombolisis, lo cual es menor a lo obtenido con la misma envejecidos que se muestran en el presente estudio se realizaron bajo una anticoagulación suave con heparina.

dosis en animales con coágulos recientes (76 %). Con 500.000 IU de urocinasa se observó igualmente una incrementada resistencia a la trombolisis en coágulos envejecidos durante 1 ó 3 días (33 % lisis), comparados con coágulos recientes (44 % lisis). En coágulos envejecidos durante 7 días el grado de trombolisis espontánea aumentó a 44 %. La infusión de 100.000 IU de activador del plasminógeno originó un grado de trombolisis significativamente más alto (74 %), mientras que la infusión de 500.000 IU de urocinasa no originó un incremento en trombolisis (48 %).

La infusión local de ambos activadores del plasminógeno, de una o dos cadenas, en conejos con coágulos envejecidos durante 1 ó 3 días originó un grado mucho más alto de trombolisis que el obtenido por infusión sistémica (Tabla II). Así, 20.000 IU administradas localmente producen 64 % de lisis en coágulos de 1 ó 3 días de edad, mientras que 100.000 IU administradas sistémicamente produce 44 % de trombolisis. Del mismo modo, 100.000 IU de urocinasa administrada localmente originó un grado de trombolisis similar al obtenido con 500.000 IU administradas sistémicamente.

Los cambios de radioactividad en sangre durante trombolisis se resumen en la Figura 2. Después del restablecimiento del flujo sanguíneo, la radioactividad en la sangre se elevó a aproximadamente el 5 % de la radioactividad inyectada, probablemente debido al fibrinógeno marcado no coagulado así como a la radioactividad libre. En los experimentos con trombos recientes la radioactividad en sangre declinó lentamente en el grupo control y en el

grupo con dosis bajas de urocinasa (no mostrado) hasta aproximadamente el 50 % del valor inicial después de horas. La infusión sistémica de 20.000 IU de activador de plasminógeno originó una disminución retrasada de radioactividad en sangre. Con 50.000 IU de activador del plasminógeno la radioactividad en sangre se elevó 25 %, con 500.000 IU de urocinasa 75 % y con 100.000 IU de activador del plasminógeno 400 %.

En todos los experimentos con infusión sistémica la radioactividad en sangre no cambió significativamente en los grupos control, pero se elevó 2.5 veces después de una infusión de 500.000 IU de urocinasa y 3.5 veces después de una infusión de 100.000 IU de activador del plasminógeno (Figura 2). La infusión local de 100.000 IU de urocinasa produjo un incremento de la radioactividad en sangre de 2.5, mientras que 20.000 IU de activador de plasminógeno produjo un incremento de casi 20 veces.

La infusión local de 5.000 IU de activador del plasminógeno o de 20.000 IU de urocinasa no produjo un incremento de la radioactividad en sangre. Estos hallazgos confirman la especificidad más elevada en actividad trombolítica de activador de plasminógeno comparado con la urocinasa.

La infusión de 5.000 IU (55  $\mu$ g) de activador del plasminógeno produce un nivel en estado estacionario de activador del plasminógeno en la sangre, durante el curso de la infusión, de  $0.79 \pm 0.13$  IU o  $8.7 \pm 1.4$  ng ( $n = 32$ ) por ml (media  $\pm$  SEM de todas las medidas 2 y 4 horas después del comienzo de la infusión). Con 20.000 IU (220  $\mu$ g) la concentración se elevó a  $3.4 \pm 0.31$  IU o  $37 \pm 3.4$  ng ( $n = 40$ ) por ml, y con 100.000 IU (1.1 mg) a  $14 \pm 2.0$  IU o  $160 \pm 22$  ng ( $n = 56$ ) por ml. Estos hallazgos indican que la concentración de activador de plasminógeno en la sangre es proporcional a la tasa de su infusión que con una tasa de infusión constante, se obtiene una concentración constante en estado estacionario.

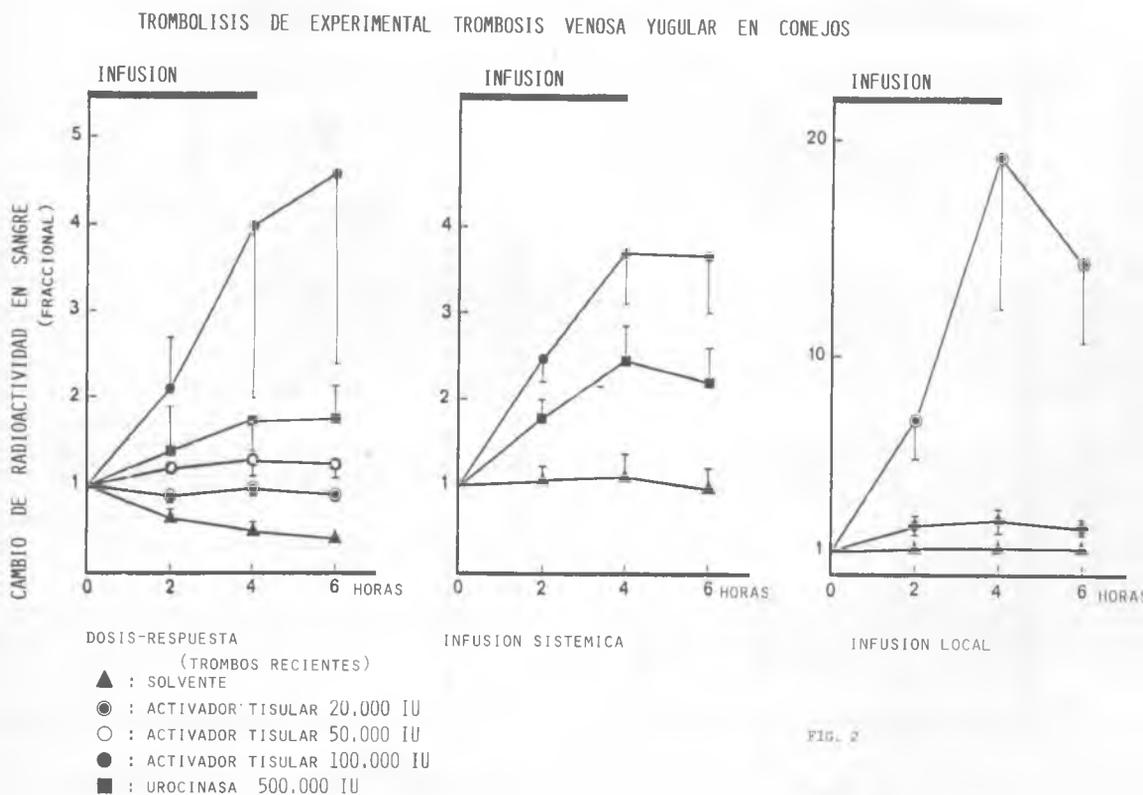


FIG. 2

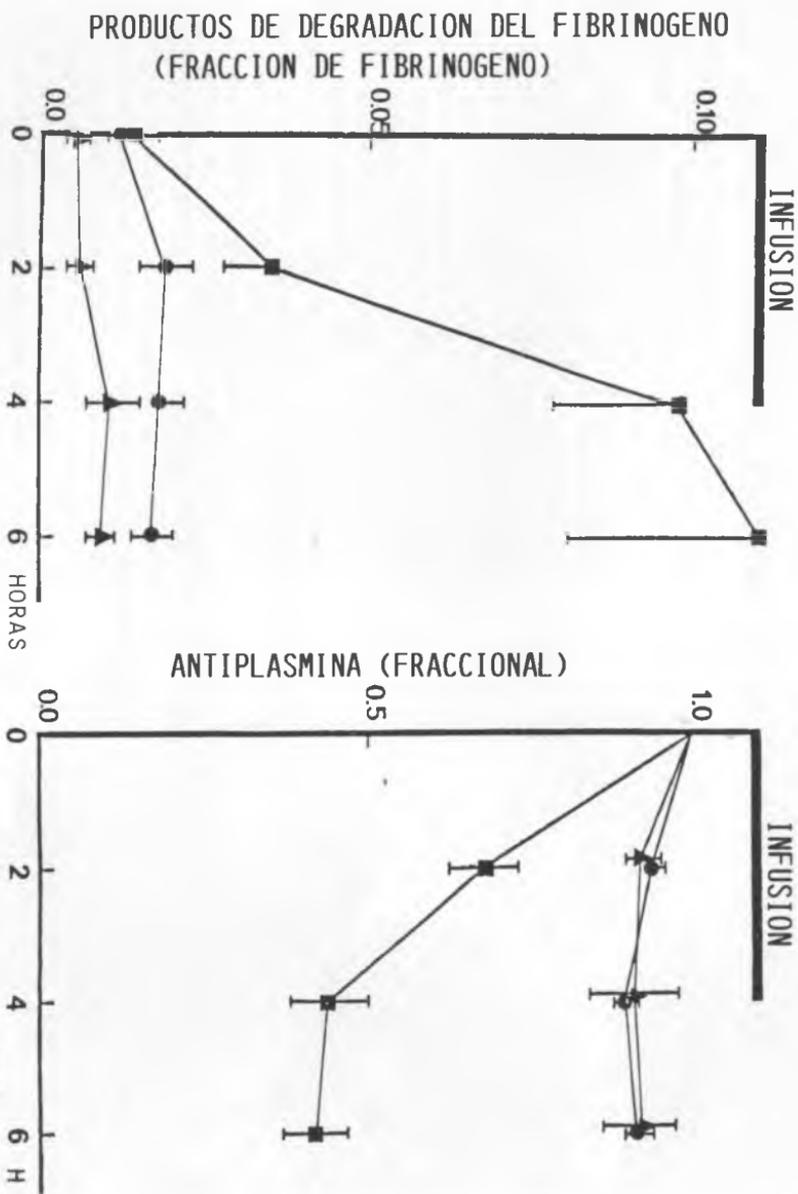
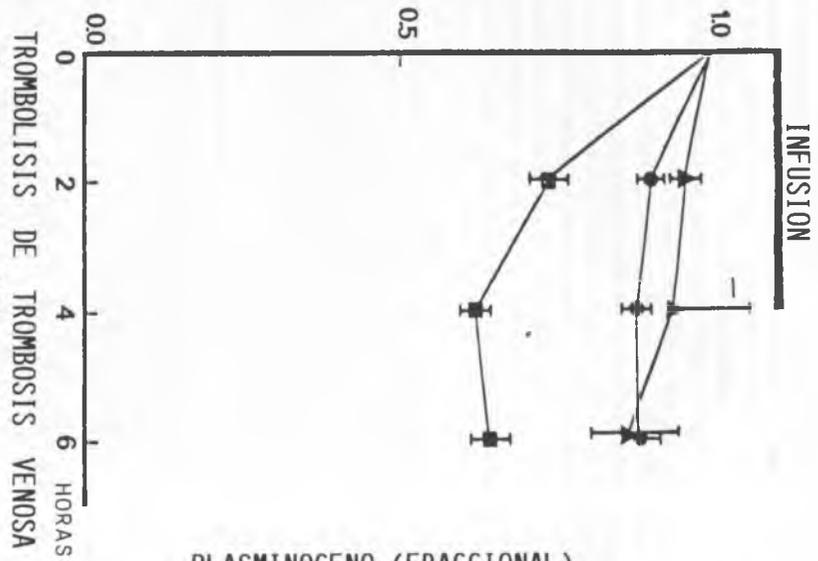
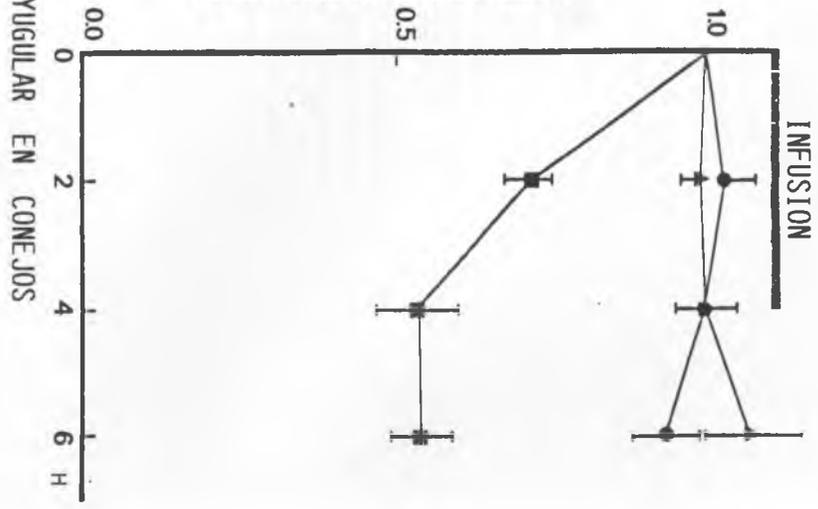


FIG. 3

FIBRINOGENO (FRACCIONAL)



PLASMINOGENO (FRACCIONAL)



La Figura 3 muestra la evolución de los parámetros hemostáticos más relevantes en la sangre durante y 2 horas después de la infusión. El nivel del fibrinógeno permanece esencialmente inalterado en los grupos control y en los grupos con una infusión de 100.000 IU de activador del plasminógeno; en estos grupos, sólo se generaron pequeñas cantidades de productos de degradación del fibrinógeno. Sin embargo, la infusión de 500.000 IU de urocinasa estuvo asociada con una defibrinogénación parcial evidenciada por una disminución del nivel de plasminógeno plasmático a un 65 % y la generación de productos de degradación del fibrinógeno hasta una concentración equivalente 10% del fibrinógeno plasmático. La infusión de activador del plasminógeno o de urocinasa a las concentraciones usadas en los otros grupos experimentales no produjo cambios medibles en los niveles plasmáticos de fibrinógeno o productos de degradación del mismo. En la línea de estas observaciones, la infusión de 500.000 IU de urocinasa provocó una extensiva activación sistémica del sistema fibrinolítico con una caída del nivel de plasminógeno hasta aproximadamente 55 % del valor de preinfusión y de  $\alpha_2$ -antiplasmina hasta aproximadamente 40 por ciento.

En los otros grupos experimentales no se observó una activación sistémica del sistema fibrinolítico.

En un modelo de trombosis venosa femoral en perro, se evaluó el efecto trombolítico del activador del plasminógeno de una o dos cadenas comparado con urocinasa. Una vena femoral fue expuesta mediante una incisión de 5 cm en la región inguinal. La vena se limpió desde la entrada de la vena femoral en la ingle hasta la unión safeno-femoral. Se ligaron las ramas laterales pequeñas, excepto la rama predominantemente musculocutánea, la cual se canuló con una cánula Portex "pink gauge" (Portex, Hythe, U. K.) de 5 cm de longitud. Un hilo de lana se introdujo en el lumen de la vena por una distancia de 4 cm. Cuando la hemorragia cesó la vena se pinzó tanto proximal como distalmente para aislar el segmento venoso, al cual se le vació toda la sangre mediante succión vía catéter. El volumen del segmento se calculó mediante una inyección de suero fisiológico contenido en una jeringa volumétrica, hasta que el vaso quedó totalmente distendido.

El trombo se produjo de la siguiente manera: aproximadamente 10-20  $\mu$ l de fibrinógeno humano marcado con  $^{125}$ I, conteniendo unas  $3 \times 10^6$  cpm, fueron aspirados en una jeringa de 1.0 ml y seguidos por un volumen de sangre fresca correspondiente al volumen calculado del segmento venoso aislado. El segmento fue entonces vaciado mediante extracción del suero fisiológico a través del catéter lateral e inyectado rápidamente con 0,1 ml de trombina (100 NIH U/ml), al mismo tiempo que se inyectaba el volumen de sangre conteniendo el fibrinógeno radioactivo.

Los experimentos de trombolisis se realizaron bajo una heparinización mínima una vez confirmada por rayos X la formación adecuada del trombo. La heparina (100 U/kg) fue inyectada de manera intravenosa y durante el experimento se administraron cantidades de 50 U/kg cuando el tiempo de coagulación de la sangre total se aproximaba a los valores normales. La vejiga fue vaciada cada hora, el volumen de orina fue medido y se tomó una alícuota para contaje isotópico.

El grado de trombolisis y el balance de recuperación isotópica se muestran en la Tabla I. En el grupo control el grado promedio de trombolisis fue  $16.3 \pm 3.8$  por ciento.

En los animales administrados 2.500 IU/kg/hora durante 4 horas, la trombolisis fue  $17.4 \pm 3.7\%$ , lo cual es muy

similar a la del grupo control. La infusión de 25.000 IU urocinasa por kg por hora durante 4 horas resultó en  $40.6 \pm 4.8\%$  de trombolisis, lo cual es significativamente más alto que el valor control ( $p < 0.001$ ) (Tabla III)

TABLA III

Lisis de experimental trombosis venosa femoral en perr

	N	Trombolisis %	p	Recuperación isotópica
Controles	6	$16,3 \pm 3,8$		$91,9 \pm 4$
Urocinasa				
2.500 IU/kg/h - 4 hs.	5	$17,4 \pm 3,7$	$> 0.4$	$92.4 \pm 2$
25.000 IU/kg/h - 4 hs.	4	$40,6 \pm 4,8$	$< 0,001$	$89,1 \pm 4$
Activador tisular de 1 cadena				
2.500 IU/kg/h - 4 hs.	5	$33,5 \pm 7,8$	$< 0,05$	$84,5 \pm 5$
Activador tisular de 2 cadenas				
25.000 IU/kg/h - 4 hs.	5	$60,1 \pm 10,8$	$< 0,001$	$79,3 \pm 4$
Activador tisular de 1 cadena				
75.000 IU/kg/h - 4 hs.	1	57,5		85,9
Activador tisular de 2 cadenas				
75.000 IU/kg/h - 4 hs.	1	72,9		92,0

La infusión de 2.500 IU de activador del plasminógeno de dos cadenas, dio  $60.1 \pm 10.8\%$  de lisis ( $p < 0.001$ ). Sorprendentemente, el grado de trombolisis que siguió la infusión de 100.000 IU de activador del plasminógeno de una cadena fue  $33.5 \pm 7.8\%$ , lo cual es significativamente más alto que el valor control ( $p < 0.05$ ), pero significativamente más bajo que el valor obtenido con activador de dos cadenas ( $p < 0.05$ ). Puesto que las mismas cantidades de actividad de activador del plasminógeno y urocinasa corresponden a cantidades molares similares, estos datos indican que el activador del plasminógeno tiene un efecto trombolítico específico más alto que la urocinasa.

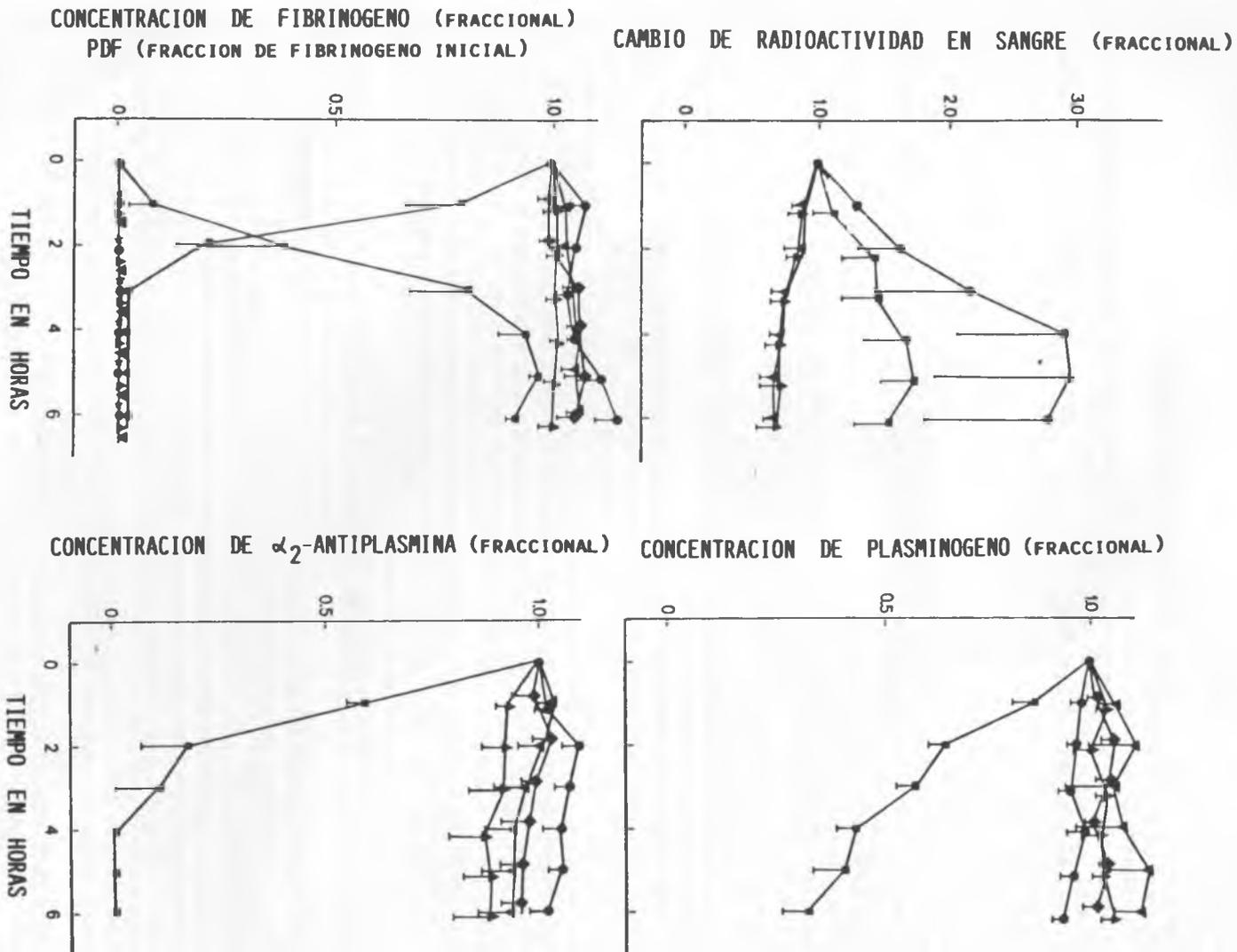
En un experimento, la infusión de 75.000 IU/kg/hora de activador del plasminógeno de dos cadenas produjo  $72.9\%$  de lisis. Una sola infusión de 300.000 IU de activador de una cadena produjo  $57.5\%$  de lisis.

Un balance de recuperación isotópica se hizo (como se describe en Métodos) para asegurar que no se perdían partes significativas del trombo. La recuperación fue aproximadamente 90% en el control y en los grupos tratados con urocinasa, y aproximadamente 80% en ambos grupos tratados con activador del plasminógeno (Tabla I). Se puede asumir que en casos de una extensiva trombolisis los productos de degradación de la fibrina marcados con  $^{125}$ I se distribuyen en un volumen de fluidos del organismo tres veces mayor que el volumen de sangre.

La Figura 4 representa la evolución de los parámetros sanguíneos relevantes durante los experimentos de trombolisis. Todos los parámetros fueron expresados como una fracción de los valores obtenidos antes de comenzar la infusión, con el fin de normalizar los datos. Después de la restauración del flujo sanguíneo (muestra 0), la radioactividad en la sangre aumentó. La infusión de activador del plasminógeno de dos cadenas incrementó la radioactividad en sangre tres veces, mientras que la infusión de 1.000.000 IU de urocinasa la incrementó dos.

La parte inferior de la Figura 4 representa la evolución del fibrinógeno de los productos de degradación del fibrinó-

TROMBOSIS VENOSA FEMORAL EN PERROS



Korninger et al., J.Clin.Invest. 1982, 69: 573-580

FIG. 4

geno (PDF) en sangre durante y 2 horas después de la infusión. El nivel de fibrinógeno permanece esencialmente inalterado en los grupos experimentales tratados con suero fisiológico, urocinasa en dosis bajas y ambos grupos tratados con dosis altas o bajas de activador del plasminógeno, y en estos grupos no se generaron productos de degradación del fibrinógeno. Sin embargo, la infusión de 1.000.000 IU de urocinasa estuvo asociada con una completa defibrinogénesis evidenciada por una desaparición del fibrinógeno plasmático y la generación de altas concentraciones de productos de degradación. En la línea de estas observaciones, la infusión de 1.000.000 IU de urocinasa provocó una extensiva activación fibrinolítica sistémica con una caída del plasminógeno hasta aproximadamente 30% del valor de preinfusión y un agotamiento completo de  $\alpha_2$ -antiplasmina (Figura 4). En los otros grupos experimentales no se observó una activación sistémica del sistema fibrinolítico.

La administración de dosis elevadas de urocinasa invariablemente produjo una abundante hemorragia en las heridas originadas en la cirugía y en los lugares de puntura, mientras que estos problemas no aparecieron en los otros grupos experimentales.

#### 2.5. Propiedades trombolíticas del activador tisular del plasminógeno en el hombre. Activador tisular purificado

a partir del medio de cultivo de una línea celular humana ha sido administrado por nuestro grupo a unos pocos pacientes con trombosis renal e iliofemoral.<sup>(26)</sup> Se consiguió trombolisis sin activación de la fibrinolisis sistémica ni perjuicio hemostático. Una limitación severa de este tipo de experimento terapéutico es el hecho de que cantidades suficientes de activador tisular por el momento sólo pueden obtenerse a partir de una línea celular originada a partir de un melanoma maligno. A pesar de la selectividad y efectividad aparentes y de la ausencia de efectos laterales tóxicos, los experimentos terapéuticos sólo pueden aplicarse a aquellos pacientes en los que el tromboembolismo amenaza la vida y en los que otros tipos de terapia han fracasado.

Una posibilidad para resolver este problema sería obtener activador tisular a partir de cultivos de células no malignas, como por ejemplo cultivos primarios o endotelio vascular humano.<sup>(1)</sup> No obstante, las perspectivas de obtener una producción masiva a partir de tales cultivos son limitadas. Otra posibilidad consistiría en la biosíntesis bacteriana a través de la incorporación del gen para activador tisular en un plásmido.<sup>(17, 18)</sup> Nosotros adaptamos la última opción, es decir, la producción a gran escala de activador tisular humano del plasminógeno por medio de la ingeniería genética.<sup>(6, 7)</sup>

## BIBLIOGRAFIA

- 1 BYKOWSKA, K.; LEVIN, E. G.; RIJKEN, D. C.; LOSKUTOFF, D. J.; COLLEN, D.: Characterization of a plasminogen activator secreted by cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 703:113-115, 1982
- 2 CASH, J. D.: Control mechanism of activator release. In: Davidson, J. F.; Rowan, R. M.; Samama, M. M.; Desnoyers, P. C. (eds.), *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, vol. 3. Raven Press, New York, pp. 65-75, 1978.
- 3 COLLEN, D.: Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.*, 69:209-216, 1976.
- 4 COLLEN, D.: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thrombos Haemost.*, 43:77-89, 1980.
- 5 COLLEN, D.; STASSEN, J. M.; VERSTRAETE, M.: Thrombolysis with human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in rabbits with experimental jugular vein thrombosis. Effect of molecular forms and dose of activator age of thrombus, and route of administration. *J. Clin. Invest.*, 71: 368-376, 1983.
- 6 COLLEN, D.; VERSTRAETE, M.: Systemic thrombolysis therapy in acute myocardial infarction? *Circulation*, 68:462-465, 1983.
- 7 COLLEN, D.; STASSEN, J. M.; MARAFINO, B.; BUILDER, S.; DE COCK, F.; AGEZ, J.; TAJIRI, D.; PENNICA, D.; BENNETT, W.; SALVA, J.; ZAMARRON, C.; HOYNG, C. (Submitted for publication): Biological properties of human tissue-type plasminogen activator obtained by expression of recombinant DNA in mammalian cells.
- 8 DAVIDSON, J. F.; LOCHHEAD, M.; McDONALD, G. A.; McNICOL, G. P.: Fibrinolytic enhancement by stanozolol: a double blind trial. *Br. J. Haematol.*, 22:543-559, 1972.
- 9 HOYLAERTS, M.; RIJKEN, D. C.; LIJNEN, H. R.; COLLEN, D.: Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *Thrombos. Haemost.*, 46:162 (Abstract 494), 1981.
- 10 HOYLAERTS, M.; RIJKEN, D. C.; LIJNEN, H. R.; COLLEN, D.: Kinetics of activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 257:2912-2919, 1982.
- 11 KORNINGER, C.; COLLEN, D.: Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. *Thrombos Haemost.*, 46:561-565, 1981.
- 12 KORNINGER, C.; COLLEN, D.: Neutralization of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human plasma: no evidence for a specific inhibitor. *Thrombos Haemost.*, 46:662-665, 1981.
- 13 KORNINGER, C.; STASSEN, J. M.; COLLEN, D.: Turnover of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in rabbits. *Thrombos Haemost.*, 46:658-661, 1981.
- 14 KORNINGER, C.; MATSUO, O.; SUY, R.; STASSEN, J. M.; COLLEN, D.: Thrombolysis with human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in dogs with femoral vein thrombosis. *J. Clin. Invest.*, 69:573-580, 1982.
- 15 MATSUO, O.; RIJKEN, D. C.; COLLEN, D.: Comparison of the relative fibrinolytic, fibrinolytic and thrombolytic properties of tissue plasminogen activator and urokinase in vitro. *Thrombos Haemost.*, 45:225-229, 1981
- 16 MATSUO, O.; RIJKEN, D. C.; COLLEN, D.: Thrombolytic properties of human tissue plasminogen activator, as compared to urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus. *Nature*, 291:590-591, 1981
- 17 OPDENAKKER, G.; WEENING, H.; COLLEN, D.; BILLIAU, A.; DE SOMER, H.: Messenger RNA for human tissue activator. *Eur. J. Biochem.*, 121:269-272, 1982.
- 18 PENNICA, D.; HOLMES, W. E.; KOHR, W. J.; HARKINS, R. N.; VEHAR, G.; WARD, C. A.; BENNETT, W. F.; YELVERTON, E.; SEEBURG, P. H.; HEYKER, H. L.; COEDDEL, D. V.; COLLEN, D.: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator DNA in *E. coli*. *Nature*, 301:214-221, 1979.
- 19 NILSSON, I. M.: Effect of drugs on activator synthesis and release. In: Davidson, J. F.; Rowan, R. M.; Samama, M. M.; Desnoyers, P. C. (eds.), *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, vol. 3. Raven Press, New York, pp. 77-89, 1978.
- 20 RIJKEN, D. C.; WIJNGAARDS, G.; ZAAL-DE JONG, M.; WELBERGEN, J.: Purification and partial characterization of plasminogen activator from human aortic tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 580:140-153, 1979.
- 21 RIJKEN, D. C.; COLLEN, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 256:7035-7041, 1981.
- 22 RIJKEN, D. C.; HOYLAERTS, M.; COLLEN, D.: Fibrinolytic properties of human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 257:2920-2925, 1982.
- 23 RIJKEN, D. C.; JUHAN-VAGUE, I.; DE COCK, F.; COLLEN, D.: Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two-site immunoradiometric assay. *J. Lab. Clin. Med.*, 101:274-284, 1983.
- 24 RIJKEN, D. C.; JUHAN-VAUGUE, I.; COLLEN, D.: Complexes between tissue-type plasminogen activator and proteinase inhibitor in human plasma, identified with immunoradiometric assay. *J. Lab. Clin. Med.*, 101:285-294, 1983.
- 25 VERSTRAETE, M.: A far reaching program: rapid, safe, and predictable thrombolysis in man. In: Kline, D. L.; Reddy, K. N. N. (eds.), *Fibrinolysis*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 185-200, 1980.
- 26 WEIMAR, W.; STIBBE, J.; VAN SEYEN, A. J.; BILLIAU, A.; DE SOMER, H.; COLLEN, D.: Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet*, ii:1018-1020, 1981.
- 27 WIMAN, B.; COLLEN, D.: Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*, 272:549-550, 1978.