

Estudio sobre la depleción e incorporación de plasminógeno en una trombosis venosa experimental

J. Fontcuberta¹ - J. Latorre² - A. Rosendo³ - I. Elez¹

Servicios de Hematología y de Cirugía Vascular del
Hospital de Sant Pau, Barcelona

Servicio de Cirugía Vascular
Hospital General. Vigo
(España)

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es estudiar, en modelos animales de trombosis venosa, la depleción e incorporación de plasminógeno a trombos de diferente grado de antigüedad, con la finalidad de diseñar pautas de tratamiento trombolítico más eficaces que el tratamiento convencional.

Los estudios relativos al contenido de plasminógeno del trombo demuestran que, en trombosis experimentales venosas, a partir del 5^o día de haber producido la trombosis, el contenido de plasminógeno del trombo disminuye muy significativamente. Estos datos apoyan el hecho de que determinadas trombosis venosas de más de 5 días de antigüedad sean resistentes al tratamiento trombolítico convencional.

En relación, a la vida media del plasminógeno en perros beagles debemos de manifestar, que por nuestros trabajos experimentales, es próxima a las 16 h. De otra parte el estudio de la incorporación de ¹²⁵Lis-plasminógeno, a trombos experimentales de distinta antigüedad, demuestra que dicha incorporación es de un 54% en trombosis de 3 días y de un 17% en trombosis de 5 días de antigüedad.

En conclusión podemos sugerir que la resistencia al tratamiento trombolítico convencional, de trombosis venosas antiguas (antigüedades de 5-7 días), probablemente se debe a un empobrecimiento en plasminógeno del trombo. Asimismo el aporte exógeno de Lis-plasminógeno no logra un enriquecimiento suficiente del trombo en plasminógeno. Por lo tanto la terapéutica de aporte exógeno de plasminógeno se desaconseja para trombosis relativamente antiguas (≤ 5 días de antigüedad).

glicoproteína, de una sola cadena, con 24 puentes disulfuro, un 2% de contenido de carbohidratos y la presencia de cinco estructuras homólogas en forma de «bucle» denominadas como lugares de alta afinidad por la lisina (LBS) (1). Dicho zimógeno es el elemento central del sistema fibrinolítico humano, pues su activación implica la formación del enzima plasmina, con una extraordinaria capacidad proteolítica. En efecto, la plasmina es capaz de degradar a la fibrina, al fibrinógeno, a los factores V y VIII de la coagulación y a otras proteínas (2).

El plasminógeno circulante o nativo posee un ácido glutámico en su extremo amino-terminal, de ahí el nombre de gluplasminógeno. Esta forma nativa del plasminógeno, mediante una proteólisis limitada inducida por la plasmina, se convierte en un plasminógeno parcialmente degradado, con aminoácidos tipo valina, metionina o lisina en su extremo amino-terminal. A este tipo de plasminógeno se ha convenido en denominarlo lis-plasminógeno (3, 4). En su estado fisiológico, el gluplasminógeno se encuentra en cuatro formas diferentes: en forma libre, representando el 20% del «pool» total, o en forma de complejos con: la α_2 antiplasmina (15% del total) el fibrinógeno o fibrina (15% del total) y la glicoproteína rica en histidina (50% del total) (5).

El plasminógeno puede unirse específicamente a la fibrina gracias a

1. Servicio Hematología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

2. Servicio Cirugía Vascular. Hospital Sant Pau. Barcelona.

3. Servicio Cirugía Vascular. Hospital General de Vigo.

Introducción

El plasminógeno es un zimógeno sintetizado en el hígado y de un peso molecular próximo a los 90.000 daltons. Su estructura es la de una

SUMMARY

The objective of this piece of work is to study (using animals): venous thrombosis, the depletion and incorporation of plasminogen in thrombus of different stages of time, in order to devise better guide lines for the treatment of thrombosis than the conventional treatment.

The studies relating to the plasminogen content of the thrombus show us that, on experimental venous thrombosis, as from the fifth day after which it occurred, the content of the plasminogen thrombus is reduced considerably. This data underlines the fact some venous thrombosis of over five days are resistant to conventional thrombolytic treatment.

In relation to this we have to report that the mean lifespan according to our experiments of the plasminogen on beagle dogs is approximately sixteen hours. On the other hand the study of the addition of ¹²⁵Lis-plasminogen, on experimental thrombosis of different stages of oldness show us that the above addition results in a 54% intake into the thrombus on three day, old thrombosis and 17% on five day old thrombosis.

In conclusion we can suggest that the resistance to conventional thrombolytic treatment of old venous thrombosis (5-7 days old) is probably due to a reduction of efficiency of the thrombus plasminogen. At the same time the contribution of exogenous lis-plasminogen does not produce a sufficient enrichment of the thrombus in plasminogen. Therefore the therapeutic exogenous plasminogen addition is not advisable for relatively old thrombosis (≤ 5 days old).

sus LBS. Se sabe que, tanto en sistemas purificados como en plasma, el lis-plasminógeno posee 3-4 veces mayor afinidad por la fibrina que el glu-plasminógeno (6). Esta mayor afinidad del lis-plasminógeno por la fibrina probablemente se debe al hecho de que esta forma, parcialmente degradada, de plasminógeno no posee interacciones intramoleculares en la región amino-terminal, que hacen que los LBS-I se hallen parcialmente escondidos, como ocurre en el caso de la forma glu-plasminógeno (7).

En condiciones fisiológicas el plasminógeno es activado en plasmina por el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y por los activadores tipo Uroquinasa, de una cadena (scu-PA) y de dos cadenas (tcu-PA), liberados por el endotelio vascular por estímulos no muy bien definidos. Estos activadores del plasminógeno poseen una gran afinidad por la fibrina, de tal manera que prácticamente no interactúan con el plasmi-

nógeno circulante, sino sólo con el que se halla unido a la fibrina por sus LBS. En estas condiciones estos activadores transforman en la superficie del trombo el plasminógeno en plasmina. Dicha plasmina no es inhibida por la α_2 antiplasmina, inhibidor específico de la misma, por poseer sus LBS ocupados en su unión con la fibrina. De esta forma se genera plasmina en el interior del trombo y éste es degradado; cuando este hecho se produce y la plasmina se libera de la fibrina, inmediatamente es inhibida, en el medio plasmático, por la α_2 antiplasmina.

Según esta teoría propuesta por **Wiman y Collen** (8) se comprende que el contenido de plasminógeno del trombo es esencial para que éste pueda ser degradado por la plasmina. Datos clínicos indirectos parecen confirmar esta teoría. Así es sabido que trombosis venosas antiguas (7-10 días) son muy resistentes al tratamiento trombolítico clásico con Estreptoquinasa (SK) y Uroquinasa

(UK). Tanto es así, que en 1980 la «Consensus Development Conferencas» sobre tratamiento trombolítico desaconsejó el uso de trombolíticos para el tratamiento de trombosis venosas profundas (TVP) de más de 7 días de antigüedad (9).

A la luz de los conocimientos actuales, el objetivo del presente trabajo es estudiar, en modelos animales de trombosis venosas, la depleción e incorporación de plasminógeno a trombos de diferente grado de antigüedad, con el fin de diseñar pautas de tratamiento trombolítico más racionales.

Material y métodos

Purificación y marcaje isotópico del plasminógeno

El plasminógeno humano fue purificado a partir de plasma fresco de donantes (2.000 ml.) mediante afinidad cromatográfica y gel-filtraciones según técnica de **Deutsch** (10). La identificación del plasminógeno eluido se efectuó mediante una técnica de sustratos cromogénicos (11). La pureza del material obtenido se comprobó mediante geles de poliacrilamida en SDS según método de **Weber**.

El plasminógeno fue marcado con ¹²⁵Iodo según técnica de **Fraker** (13). La eliminación del Iodo libre se efectuó mediante un gel-filtración en una columna de Sephadex de 0,5 x 15 cm.

Modelo animal de trombosis venosa

Como modelo de trombosis venosa en perros se siguió el descrito por **Dupe** et al. (14), introduciendo algunas modificaciones. Para realizar las trombosis experimentales se utilizaron perros de raza beagle con un peso que oscilaba entre 9 y 11 kg. Se practicó anestesia general de los animales con Tiobarbital y Pavulon como curarizante. Asimismo se efectuó una intubación endotraqueal y

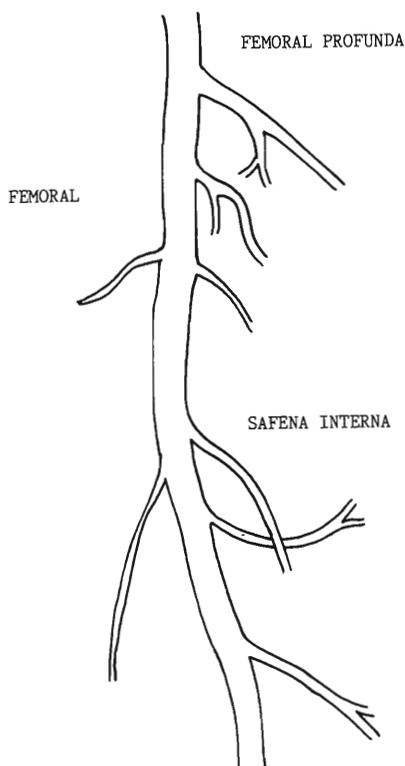


Fig. 1 - Detalle anatómico de la vena femoral y sus colaterales.

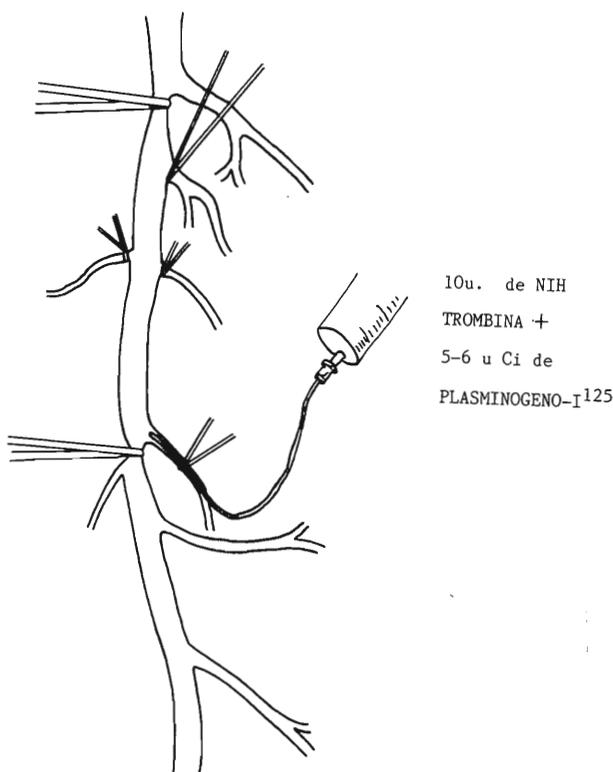


Fig. 2 - Clampaje de la vena femoral e introducción de un catéter por safena interna.

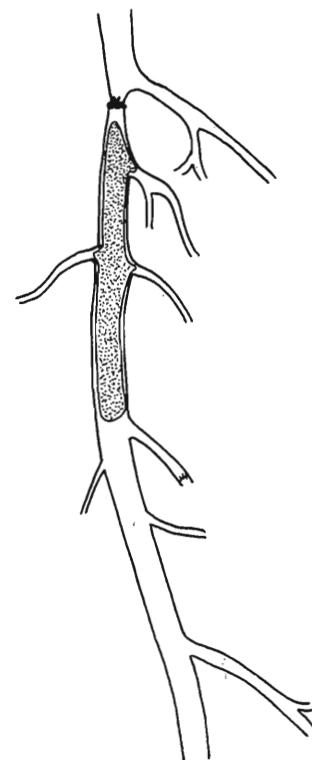


Fig. 3 - Formación del trombo venoso.

se mantuvo al animal con respiración asistida. En la extremidad contralateral se canalizó una vena para realizar diversas extracciones.

En la extremidad donde se decidió efectuar la trombosis se practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 7 cms., en la región inguinocrural. A continuación se procedió a la disección y control de la vena femoral superficial. Posteriormente se aisló un segmento de 5 cms mediante ligadura de todas sus colaterales a excepción de la safena interna, que fue cateterizada. Una vez aislado el segmento de femoral superficial, se procedió a su clampaje proximal y distal. A través de la safena cateterizada, se vació la sangre del segmento venoso aislado y se procedió a su llenado con suero fisiológico, con el fin de determinar su volumen total. A continuación,

se vació dicho segmento venoso.

Para inducir la trombosis venosa experimental, se administraron por la safena cateterizada 10 U. NIH de trombina humana (Fibrindex, Ortho Diagnostic) en inyección rápida. A continuación se administró el mismo volumen de sangre total del animal que había en el segmento venoso aislado, y se añadieron 5-6 μ Ci (7-10 $\times 10^3$ cpm) de plasminógeno marcado con 125 Iodo. Una vez administrada esta solución trombogénica el clampaje del segmento venoso aislado se mantuvo durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el clampaje distal y el trombo quedó formado. Una vez formado el trombo, éste se extrajo mediante flebotomía en distintos períodos de tiempo. En las figuras 1, 2 y 3 se especifican los detalles técnicos de la formación de la trombosis venosas experimentales.

Estudio de la depleción de plasminógeno del trombo

Mediante la técnica de inducción de trombosis experimentales, expuesta anteriormente, a una serie de 12 perros beagles de 9-11 kg. se les practicó un trombo experimental. Para producir dicho trombo se utilizó sangre total de los animales (aproximadamente 2 ml.), 10 U. NIH y plasminógeno humano purificado (glu-plasminógeno) y marcado con 125 Iodo (7-10 $\times 10^3$ cpm). Una vez producida la trombosis venosa experimental, al cabo de 5 días (n = 6 perros) y 10 días (n = 6 perros), se extrajeron los trombos y se cuantificó su contenido en plasminógeno radioactivo mediante un contador gamma para 125 Iodo (Intertechnique Compteur Gamma CG 4000). Todos los resultados fueron expresados en % de disminución de la radioactividad inicial.

Metabolismo del plasminógeno en perros beagles

Con la finalidad de poder determinar la frecuencia con que había que administrarse el plasminógeno a los perros beagles, fue preciso realizar el metabolismo del plasminógeno y observar su vida media.

Para este tipo de experimento se utilizó una serie de 6 perros beagles de 9-11 kg. Dos días antes de efectuar el metabolismo del plasminógeno, los perros fueron tratados con Lugol (7-10 gotas/12 horas) con el objeto de saturar la glándula tiroidea con Iodo y evitar la incorporación de 125 Iodo a dicha glándula.

Los perros fueron anestesiados con Pentobarbital Sódico y se les implantó un catéter en ambas venas femorales. Por una de las venas femorales se les administró 6 Ci (9-10 x 10³ cpm) de plasminógeno marcado con 125 Iodo, disuelto en 10 c.c. de suero fisiológico. Una vez inyectado el plasminógeno marcado, la jeringa utilizada fue lavada en dos ocasiones con suero fisiológico y el contenido fue inyectado al animal con el objeto de administrar el máximo de plasminógeno marcado que pudiera haberse adherido a la jeringa y al catéter utilizados. No obstante, para cuantificar la radioactividad residual no inyectada al animal, todo el material utilizado fue lavado con suero fisiológico y éste fue analizado por un contador gamma para 125 Iodo.

Después de haber inyectado el plasminógeno marcado, para cuantificar la radioactividad del animal, se efectuaron diversas extracciones de sangre secuenciales, en tubos de citrato trisódico al 3,8%. Durante la primera hora del experimento se efectuaron tres extracciones (10 minutos, 30 minutos y una hora). Posteriormente se efectuó una extracción cada tres horas hasta las 15 horas del experimento. A continuación se efectuó una extracción cada 5 horas durante las 48 horas siguientes al ex-

perimento y posteriormente cada 12 horas hasta que desapareció totalmente la radioactividad del animal. Asimismo, se recogió diariamente orina del animal y se cuantificó su radioactividad.

Todas las muestras de orina y sangre fueron analizadas en un contador gamma para 125 Iodo. Los procedimientos de análisis de datos y cálculos de los parámetros metabólicos se efectuaron según los trabajos previamente publicados por **Collen** y cols. (15).

Estudio sobre la incorporación de plasminógeno marcado con 125 Iodo en un trombo experimental

La finalidad de este experimento es saber qué cantidad de Lis-

plasminógeno, administrado por vía sistémica, es capaz de fijarse a un trombo experimental de distinta antigüedad.

A una serie de 12 perros beagles se les indujo una trombosis venosa femoral (experimental, según la técnica descrita anteriormente). A continuación se les administraron 15µ katalas (6µ Ci 10-12x10⁴cpm) de Lisplasminógeno (Substrene Inst. Choay, Paris) marcado con 125 Iodo según la técnica de marcaje anteriormente descrita. Dicho plasminógeno marcado se administró cada 15 horas mediante un catéter situado en una vena periférica de la pierna contralateral donde se había inducido la trombosis. La radioactividad residual del material utilizado para la administración del plasminógeno mar-

Tabla I

EXPERIMENTO (perro n.º)	RADIOACTIVIDAD inicial (cpm)	RADIOACTIVIDAD a los 5 días
1	7.251,0	35 %
2	6.321,3	37 %
3	7.131,7	40 %
4	6.428,2	35 %
5	5.961,0	42 %
6	6.231,1	32 %
Media	6.554,05	36,91 %
Desviación stand.	518,73	3,52 %

Tabla II

EXPERIMENTO (perro n.º)	RADIOACTIVIDAD inicial (cpm)	RADIOACTIVIDAD a los 10 días
1	8.325,3	5,0 %
2	7.571,2	5,5 %
3	5.873,0	7,0 %
4	6.921,2	9,5 %
5	6.121,1	7,1 %
6	8.145,3	8,2 %
Media	7.159,5	7,05 %
Desviación	1.028,6	1,66 %

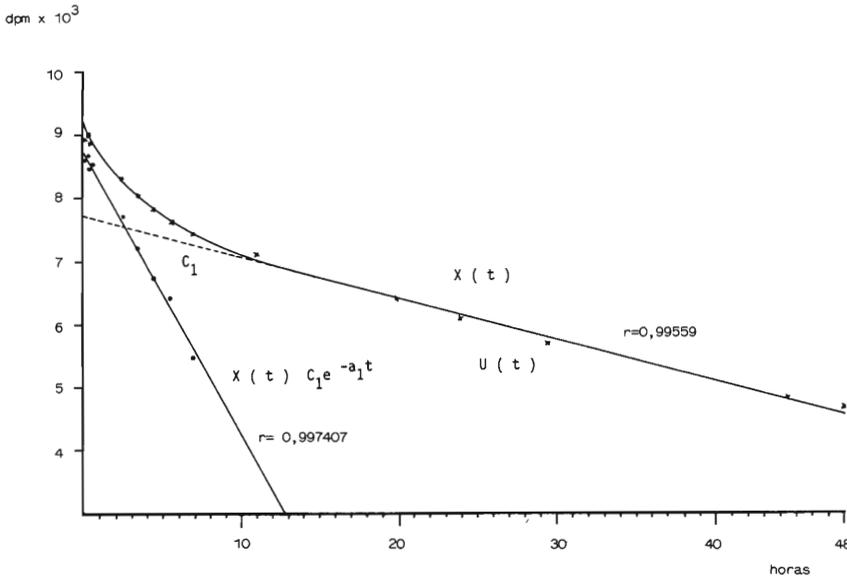


Fig. 4 - Ejemplo del metabolismo del I^{125} - Plasminógeno en perros beagles.

$X(t)$ Radiactividad plasmática

$U(t)$ Excreción urinaria diaria de material radioactivo

cado se evaluó de igual manera que en el caso del metabolismo del plasminógeno.

El estudio de la incorporación de Lis-plasminógeno marcado al trombo experimental se efectuó diariamente midiendo la radioactividad en la zona donde se había producido la trombosis. A la radioactividad detectada en la zona de la trombosis se le restó el valor de la radioactividad detectada a nivel de la zona del corazón del animal. De este modo pudo desprejarse la radioactividad inespecífica, no incorporada a la trombosis experimental. Todas las medicaciones de radioactividad a nivel de la zona de la trombosis experimental y del corazón del animal se efectuaron mediante un aparato de detección externa de radioactividad.

Dado que el método anteriormente expuesto presenta una serie de imprecisiones (radioactividad remanente de la zona quirúrgica donde se ha producido la trombosis), también se evaluó la incorporación de Lis-plasminógeno al trombo, efectuando una extracción quirúrgica del mismo. La radioactividad del trom-

bo extraído se cuantificó mediante un contador gamma para I^{125} lodo. La extracción del trombo se efectuó al cabo de 3 y 5 días después de haber inducido la trombosis venosa experimental.

Resultados

Purificación y marcaje isotópico del plasminógeno

La concentración de plasminógeno obtenida por el método de purificación anteriormente citado fue de 1,56 mg/ml.; la pureza del plasminógeno obtenido se evidenció mediante una sola banda de unos 90.000 daltons en los geles de poliacrilamida.

Con la técnica del marcaje del plasminógeno con I^{125} lodo se consiguió un rendimiento de entre 15 y 25%.

Modelo animal de trombosis venosa

En total se efectuaron 27 experimentos de trombosis venosa en perros beagles. Dos perros fallecieron en el momento de la anestesia y uno en el momento de efectuar la extrac-

ción del trombo. En cuatro ocasiones el experimento debió de repetirse por inadecuada formación del trombo. En el momento de efectuar la trombosis experimental, la incorporación de plasminógeno marcado a la misma fue del orden del 66,1% del total. Aproximadamente, un 10,2% de la radioactividad inyectada quedó fijada en el catéter y la jeringa utilizados para producir la trombosis. Un 8,3% de la radioactividad total pudo detectarse en las gasas y en material quirúrgico utilizado para efectuar las trombosis. Y un 15,4% se detectó en la sangre circulante del animal después de haber liberado las ligaduras de la trombosis experimental.

Depleción del plasminógeno del trombo

Como puede apreciarse en la Tabla I, a los 5 días de haber inducido la trombosis experimental se observó una marcadísima disminución del plasminógeno radioactivo contenido en el trombo. Asimismo, a los 10 días de haber inducido la trombosis (Tabla II) prácticamente el contenido de plasminógeno radioactivo era indetectable.

Metabolismo del plasminógeno

En la figura 4 se ilustra una de las curvas típicas de desaparición de la radioactividad en los animales estudiados.

Como puede apreciarse en dicha figura, se obtuvo una curva bifásica con una rápida caída de la radioactividad durante las 6 primeras horas del experimento. Posteriormente, a partir de las 10 horas del experimento, la radioactividad desapareció más paulatinamente.

En la tabla III se expresan los resultados individualizados en relación a la $t_{1/2}$ (vida media en horas) de los 6 perros beagles estudiados. Aproximadamente la vida media del plasminógeno en los perros beagles es de 16 horas.

Tabla III

Nº de animales	T 1/2 (horas)
1	19,32
2	14,27
3	16,69
4	15,92
5	16,32
6	16,12
Media	16,24
Desviación estandar	1,64

Tabla IV

EXPERIMENTO (perro nº)	RADIOACTIVIDAD/MG a los 3 días	RADIOACTIVIDAD/MG a los 5 días
1	55,3 %	—
2	63,5 %	—
3	57,9 %	—
4	49,7 %	—
5	53,9 %	—
6	47,3 %	—
7	—	21,2 %
8	—	16,5 %
9	—	18,7 %
10	—	13,2 %
11	—	15,6 %
12	—	17,3 %
Media	54,6 %	17,1 %
Desviación standard	5,8 %	2,7 %

Incorporación de plasminógeno a un trombo experimental

Los resultados de estos experimentos se expresaron en % de radioactividad incorporada por mg. de trombo y quedan reflejados en la tabla IV.

Como puede apreciarse en dicha tabla, los trombos relativamente frescos (3 días de antigüedad) incorporan aproximadamente en 50% del plasminógeno inyectado. Sin embargo, los trombos antiguos (5 días)

apenas incorporan un 17% del plasminógeno inyectado. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos anteriormente cuando observamos la depleción de plasminógeno de trombos experimentales de distinta antigüedad.

Discusión

Cuando se analizan los diversos trabajos sobre tratamiento trombolítico de las TVP, desde 1969 a 1987, se llega a la conclusión de que con la

utilización de SK se obtiene un 67% de desobstrucciones totales o parciales, frente a un escaso 26% obtenido con el tratamiento convencional con heparina sódica endovenosa (16). A pesar de estos resultados alentadores, diversos autores (17) han sugerido que trombosis relativamente antiguas (7-10 días) serían resistentes al tratamiento trombolítico convencional con SK o UK. Una posible explicación de este fenómeno quizás pudieran ser los cambios que experimenta el trombo a lo largo del tiempo. En este sentido diversos trabajos (18, 19) sugieren modificaciones de la fibrina y del contenido de plasminógeno del trombo en función de su grado de antigüedad. En nuestro trabajo hemos pretendido verificar, no sólo el posible empobrecimiento en plasminógeno del trombo, sino la capacidad de fijarse plasminógeno exógeno a trombos de diferente antigüedad producidos de forma experimental. El modelo animal de trombosis venosa, empleado en nuestro trabajo, ha sido utilizado por otros autores (20) para ensayar nuevos agentes trombolíticos. Dicho modelo es reproducible y ofrece una gran homogeneidad de resultados. Los trombos de diferente grado de antigüedad han permanecido relativamente estables durante el tiempo que ha durado el experimento.

Los resultados acerca de la depleción de plasminógeno en trombos de diferente antigüedad confirman los datos previamente publicados (21). En efecto, en trombos de 5 días, el contenido de plasminógeno es inferior a un 40% y en trombos de 10 días de antigüedad el contenido de plasminógeno prácticamente es nulo. Una explicación de estos resultados sería la posibilidad de que en los animales de experimentación se hubiese producido lisado, parcialmente, el trombo inicial. Apoyarían esta hipótesis los datos aportados por **Dupe** y cols. (14,22)

en modelos de trombosis venosas de distinta antigüedad realizadas en perros.

Otra posible interpretación del empobrecimiento de plasminógeno del trombo, sería el hecho de que el glu-plasminógeno utilizado en nuestros experimentos posee una relativa poca afinidad por la fibrina. Asimismo es posible que en el proceso de purificación del plasminógeno, se hayan producido modificaciones en la molécula que impliquen una menor afinidad por la fibrina. En contra de esta hipótesis se halla el dato de no haber detectado en los geles de poli-acrilamida bandas suplementarias, próximas a las del plasminógeno purificado.

En relación a los resultados sobre la incorporación de lis-plasminógeno a trombos de diferente grado de antigüedad, debemos resaltar que trombos relativamente frescos (3 días de antigüedad) incorporan aproximadamente un 50% del plasminógeno inyectado. Sin embargo, trombos de 5 días de antigüedad apenas incorporan un 15% de lis-plasminógeno. A tenor de estos resultados, debemos afirmar que la incorporación de lis-plasminógeno comercial a trombos relativamente frescos ha sido buena. Máxime cuando estos preparados tienen más de un 70% de moléculas de lis-plasminógenos (23). Como es sabido, dicha forma de plasminógeno posee 3-4 veces mayor afinidad por la fibrina que la forma glu-plasminógeno (7).

Por otra parte, estos resultados están en consonancia con los obtenidos en los experimentos sobre la depleción de plasminógeno de trombos de diferentes grados de antigüedad. Una posible explicación de la escasa incorporación de plasminógeno a los trombos relativamente antiguos, quizá sea por el hecho de que el trombo a partir de los tres días sufre fenómenos de recanalización, epitelización y proliferación de fibroblastos que impiden la incorpo-

ración de plasminógeno. Otra posible explicación es que la fibrina sufra modificaciones de su estructura que impidan que los «lisine binding sites» del plasminógeno puedan unirse a los radicales lisina de la fibrina. En cualquiera de los casos, a la luz de estos resultados, parece desaconsejable la utilización de plasminógeno exógeno, con la finalidad de enriquecer un trombo de una antigüedad superior a los 5 días.

Como conclusiones del presente trabajo podemos sugerir:

- a) La metodología utilizada para la purificación y marcaje isotópico del plasminógeno ha sido óptima y nos han permitido disponer del suficiente material para realizar los diferentes experimentos de este trabajo.
- b) La técnica quirúrgica utilizada para la inducción de trombosis experimentales, si bien no reproduce exactamente las mismas condiciones fisiopatológicas de producción de trombosis que en el hombre, sí nos ha permitido estudiar trombos de distinta antigüedad.
- c) Los estudios relativos al contenido de plasminógeno del trombo demuestran que, en trombosis venosas experimentales, a partir del 5º día de haber producido la trombosis el contenido de plasminógeno del trombo disminuye muy significativamente. A los 10 días de haber producido un trombo experimental, el contenido de plasminógenos del trombo es indetectable. Estos datos sugieren que la resistencia al tratamiento trombolítico de algunas trombosis antiguas pudiera ser debida a un empobrecimiento de plasminógeno del trombo.
- d) La vida media del ¹²⁵ Lis-plasminógeno en perros beagles es de 16 h.. El estudio de la incorporación de ¹²⁵ Lis-plasminógeno a trombos experimentales de distinta antigüedad, demuestra

que dicha incorporación es de un 54% en trombosis de 3 días y de un 17% en trombosis de 5 días de antigüedad. De estos datos se desprende que el tratamiento óptimo con Lis-plasminógeno y Uroquinasa debe realizarse en trombosis recientes.

BIBLIOGRAFIA

1. MAGNUSSON, S. L.; SOTTRUP-JENSEN, TE.; PETERSON, G.; DUDEK-WOJCIESHOWSKA, H. CLAEYS: Homologous «kringle» structure common to plasminogen and prothrombin. Substrate specificity of enzymes activating prothrombin and plasminogen. In Ribbons DW, K. Brew, Eds: Proteolysis and Physiological Regulation. Academic Press, New York, 1976, pp 203-238.
2. WIMAN, B.; LIJNEN, HR.; COLLEN, D.: On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in L₂ antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1979; 579: 142-159.
3. WALLEEN, P.; WIMAN, B.: Characterization of human plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparation. «*Biochim Biophys Acta*», 1970; 221: 20-30.
4. WALLEEN, P.; WIMAN, B.: Characterization of human plasminogen. II. Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen. «*Biochim Biophys Acta*», 1972; 257: 122-134.
5. COLLEN, D.: On the regulation and control of fibrinolysis. «*Thromb Haemost*», 1980; 43: 77-89.
6. RAKOCZI, I.; WIMAN, B.; COLLEN, D.: On the biological significance of the specific interaction between fibrin, plasminogen and antiplasmin. «*Biochim Biophys Acta*», 1978; 540: 295-300.
7. WIMAN, B.; WALLEEN, P.: Structural relationship between «glutamic acid» and «lysine» forms of human plasminogen and their interaction with the NH₂-terminal activation peptide as studies by affinity chromatography. «*Eur J Biochem*», 1975; 50: 489-494.
8. WIMAN, B.; COLLEN, D.: Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. «*Nature*», 1978; 272: 549.

9. S. SHERY.; W. R. BELL.; F. H. DUCKERT, V. GUEREWICH; A. P. FLETCHER; D. M. LONG; V. J. MARDER; H. ROBERTS; E. W. SALZMAN; A. SASAHARA; M. VERSTRAETE.: Consensus conference on thrombolytic therapy sponsored by the National Heart, Lung, and Blood Institute in collaboration with the Food and Drug Administration. 10-12 april Bethesda, USA 1980.
10. DEUTSH, D.; D. MERTZ, E. T.: Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. «Science», 1970; 170: 1095-1096.
11. FRIBERGER, P.; KNÖS, M.; GUSTAVSSON, S.; AURELL, L.; CLAESON, G.: Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251. «Haemostas», 1978; 7: 138-145.
12. WEBER, K.; OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis. «J Biol Chem», 1969; 244: 4406-4412.
13. FRAKER, P. J., and SPECH, J. C.: Protein and cell membrane iodinations with sparingly soluble chloramide. «Biochem Biophys Res Commun», 1978; 80: 849-857.
14. DUPE, R. J.; GREEN, J.; SMITH, R. A. G.: Acylated derivatives of streptokinase-plasminogen activator complex as thrombolytic agents in a dog model of aged venous thrombosis. «Thromb Haemostas», 1985; 53: 56-9.
15. COLLEN, D.: Plasminogen and prothrombin metabolism in man. Thesis, Faculty of Medicine. University of Leuven, Belgium, 1974.
16. GOLDHABER, S. Z.; BURING, J. E.; LIPNICK, R. J.; HENNEKENS, E. H.: Pooled Analyses of randomized trials of streptokinase and heparin in phlebographically documented acute deep venous thrombosis. «The Ame. J of Medicine», 1984; 76: 393-397.
17. D'ANGELO, A.; MANNUCCI, P. M.: Outcome of treatment of deep vein thrombosis with urokinase: relationship to dosage duration of therapy, age of the thrombus and laboratory changes. «Thromb Haemostas», 1984; 51: 236-239.
18. GOTTLÖB, R.; STOCKLINGER, L.; POTLING, U.; SCHATTENMAN, G.: Studies on thrombolysis with streptokinase. «Thromb Diath Haemorrh», 1971; 25: 352.
19. HEDNER, U.; NILSSON, I. M.; ROBERTSON, B.: Determination of plasminogen in clots and trombi. «Thromb Diath Haemorrh (Stuttgart)», 1966; 16: 38.
20. DUPE, R. J.; ENGLISH, P. D.; SMITH, R. A. G.; GREEN, J.: Acyl-enzymes as thrombolytic agents in dog models of venous thrombosis and pulmonary embolism. «Thrombosis and Haemostasis (Stuttgart)», 1984; 51: 248-253.
21. GOTTLÖB, R.; EL NASHEF B.; DONAS, P.; PIZA, F.; KOUB, R.: Studies on fibrinolysis with streptokinase i.v. immunofluorescent investigations of the fibrin pattern and the content of plasminogen and plasmin inhibitors in clots and thrombi of various ages. Thrombosis and Diathesis haemorrhagic (Stuttgart), 1973; 29: 393-407.
22. DUPE, R. J.; ENGLISH, P. D.; SMITH, R. A. G.; GREEN, J.: The activity of an acylated streptokinase-plasminogen complex (BRL 26921) in dog models of thrombosis. In: DAVIDSON, J. F.; BACHMANN, F.; BOUVIER, C. A.; KRUIHOF, E. K. O. (eds) Progress in fibrinolysis, vol VI. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983; pp. 240-244.
23. LORMEAU, J. C.; CHOAY, J.; GOULAY, J.; SACHE, E.; VAIREL, E. G.: Purification et propriétés des plasminogenes extraits du placenta humain. «Ann Pharm Franç», 1976; 34: 287-296.