

Grupo de trabajo de Leiden sobre fibrinólisis: Procedimientos de recogida y manipulación de sangre para la evaluación del activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y del inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1)*

Kluft C, Verheijen JH.

Gaubius Laboratory, TNO Institute of Ageing and Vascular Research, Leiden.

Kluft C, Verheijen JH.

Leiden fibrinolysis working party: blood collection and handling procedures for assessment of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

Biol Clin Hematol 1992; 14: 83-92

Procedures of blood collection and handling are different for the various variables in haemostasis and tend to change gradually with progress in knowledge and methods. The Working Party has gathered background information about procedures and discussed minimal requirements specifically for t-PA and PAI-1 assessment. The general procedure from the ECAT was taken as a reference and modified when required. The background information which was discussed is summarized and the modifications are provided in the form of minimal requirement procedures for each variable.

Key words: *Blood collection, pre-analytical variables, tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor (PAI-1)*

La motivación para organizar un Grupo de Trabajo sobre recogida y manipulación de sangre fue la serie continuada de interrogantes de los últimos años sobre los requisitos para la recogida de sangre para los nuevos ensayos específicos de t-PA y PAI-1. ¿Cuáles son los requisitos relacionados con los ensayos globales de la fibrinólisis (métodos de euglobulina y de lisis del coágulo) que deben mantenerse, cuáles son las novedades y, lo que es igualmente importante, qué restricciones se podrían suprimir?

Los elementos de estos procedimientos han sido, en ocasiones, objeto de investigaciones controladas, pero han surgido muchos preceptos a partir de la experien-

cia, las extrapolaciones y las consideraciones teóricas. Se ha encontrado, con frecuencia, que la prioridad para la publicación de datos ha sido insuficiente. El Grupo de Trabajo se fijó el objetivo de reunir información y discutir los aspectos en los que existía un consenso. Se creyó que era importante justificar los preceptos con datos.

Como base de la discusión, empleamos un procedimiento de recogida y manipulación de sangre para los ensayos de fibrinólisis, extraído de los protocolos prácticos de requisitos para un conjunto de variables de fibrinólisis y coagulación, definidas a partir de la experiencia de muchos participantes de ECAT.

Reprints Address:

C. Kluft, Gaubius Laboratory, IVVO-TNO, P.O. Box 430, 2300 AK LEIDEN, The Netherlands.

* Traducción realizada por M. de Salas, de Menarini Diagnósticos S.A. Trabajo original publicado en Fibrinolysis 1990; 4: (Supp 2) 155-161.

RESULTADOS

1. Procedimiento para el antígeno t-PA

Después de la discusión, se utilizó el siguiente procedimiento con requisitos mínimos para el antígeno del t-PA. Se supone que el ensayo del antígeno del t-PA es del tipo denominado «gran total» (ver figura 1). Se ha documentado, por lo menos, un ejemplo de este tipo de ensayos (3). En el caso de que el ensayo del antígeno de t-PA no está caracterizado o si es de sensibilidad/especificidad mixta, el procedimiento debe ser más estricto para impedir la formación de complejos entre el t-PA y los inhibidores y se podría seguir el procedimiento para la actividad del t-PA (ver más adelante).

A. Sujetos

Se extraen las muestras de sangre de sujetos en reposo (20 minutos), sentados o echados (se debe elegir una de las dos posiciones). Se prefiere el ayuno (ver las observaciones), pero se permite un desayuno ligero sin grasa, té ni café.

Se sabe que existen efectos a corto plazo, producidos por el tabaco y las bebidas alcohólicas o con cafeína; para evitarlos, los sujetos deben abstenerse de fumar y de ingerir las bebidas mencionadas durante un período mínimo de una hora antes de la punción venosa.

Se tienen que elegir y estandarizar cuidadosamente el tiempo o tiempos de extracción de sangre. Los sujetos deben tener un estilo de vida con un ritmo circadiano normal; se deben anotar las desviaciones.

B. Tubos

La sangre se puede recoger en tubos de plástico o silicónados que contengan anticoagulante.

C. Anticoagulante

Se debe emplear citrato o EDTA (ver las observaciones).

D. Técnica de extracción de sangre

Se efectúa una punción venosa bien hecha y limpia (sin mover la aguja en el interior de la vena), empleando

una estasis mínima (es aceptable la aplicación de un torniquete durante un período máximo de 2 minutos con +2 kPa, como máximo, para facilitar cada punción). Se pueden emplear tanto la técnica de flujo (suficiente) libre como la de vacío. Se descartan unos ml de sangre o no se emplea el primer tubo aspirado para este ensayo.

Después del llenado, se debe mezclar el contenido de los tubos invirtiéndolos 5 veces.

E. Preparación del plasma

Se centrifuga la sangre durante 30 minutos a $1800 \times g$, antes de 1 a 2 horas desde la punción venosa (no es necesario el enfriamiento). Después de la centrifugación, se debe extraer cuidadosamente el plasma con una pipeta y se debe recoger en un tubo pequeño o vaso de precipitación (*beaker*). Después de mezclar cuidadosamente el plasma reunido, se llenan los tubos etiquetados previamente para su conservación.

F. Congelación, almacenamiento y descongelación del plasma

Las alícuotas de plasma pueden ser congeladas y descongeladas para los ensayos mediante cualquier método. Se pueden mantener las muestras durante varias horas a temperatura ambiente hasta su análisis.

2. Procedimiento de la actividad y el antígeno del PAI-1

No se dispone aún de un inmunoensayo «gran total» para el PAI-1 (4) y se combinaron los procedimientos para los ensayos de actividad y del antígeno del PAI-1. La combinación consiste en un compromiso práctico y no ha sido optimizada para la prevención de la formación de complejos entre el PAI-1 y el t-PA endógeno (ver observaciones).

A. Sujetos

Se extraen las muestras de sangre de sujetos en reposo (20 minutos), sentados o echados (se debe elegir una de las dos posiciones). Se prefiere el ayuno (ver las observaciones), pero se permite un desayuno ligero sin grasa, té ni café.

Se sabe que existen efectos a corto plazo, producidos por el tabaco, las bebidas alcohólicas o con cafeína, y las comidas con carbohidratos ricas en calorías;

para evitarlos, los sujetos deben abstenerse de fumar y de ingerir bebidas con cafeína durante un período mínimo de una hora antes y de tomar alcohol 24 horas antes de la punción venosa.

Se tienen que elegir y estandarizar cuidadosamente el tiempo o tiempos de extracción de sangre. Los sujetos deben tener un estilo de vida con un ritmo circadiano normal; se deben anotar las desviaciones.

B. Tubos

La sangre se puede recoger en tubos de plástico o silicónados que contengan anticoagulante.

C. Anticoagulante

No es estrictamente necesaria la adición de agentes estabilizantes de las plaquetas con una manipulación cuidadosa y correcta de la sangre, y con una centrifugación adecuada en el caso de una punción venosa normal en voluntarios aparentemente sanos (ver C1). En la mayoría de las demás circunstancias se aconseja la estabilización de las plaquetas (ver C2).

C1) 0,1 volumen de citrato

C2) 0,1 volumen de citrato con un suplemento de agentes estabilizantes plaquetarios (prostaglandina E1 y teofilina; concentraciones finales en sangre 0,09 y 1 mM, respectivamente) o se pueden emplear tubos existentes en el mercado con varios tipos de suplementos (no Thrombotest, ver observaciones).

D. Técnica de extracción de sangre

Se efectúa una punción venosa bien hecha y limpia (sin mover la aguja en el interior de la vena, empleando una estasia mínima (es aceptable la aplicación de un torniquete durante un período máximo de 2 minutos con +2 kPa, como máximo, para facilitar cada punción). Se pueden emplear tanto la técnica de flujo (suficiente) libre como la de vacío. Se descartan unos ml de sangre o no se emplea el primer tubo de vacío para este ensayo.

Después del llenado, se debe mezclar el contenido de los tubos invirtiéndolos 5 veces y se colocan en una mezcla de hielo picado y agua.

E. Preparación del plasma

Se centrifuga la sangre lo más pronto posible, pero no

más de 30 minutos (sin agentes antiplaquetarios, C1) o 1 a 2 horas (con agentes antiplaquetarios, C2) después de la punción. Las condiciones mínimas son $1800 \times g$ y 30 minutos en una centrifuga fría con un rotor de oscilación hacia fuera (temperatura fijada a $+4^\circ C$).

Inmediatamente después de la centrifugación, se debe extraer cuidadosamente el plasma con una pipeta y se debe recoger en un tubo pequeño o vaso de precipitación (*beaker*). Después de mezclar cuidadosamente el plasma reunido, se llenan los tubos previamente etiquetados para su conservación.

F. Congelación, almacenamiento y descongelación del plasma

Las alícuotas de plasma deben ser congeladas. Se debe mantener una temperatura de mantenimiento constante e inferior a $-30^\circ C$. Se puede conseguir la descongelación para el ensayo mediante cualquier método, siempre que se evite una exposición prolongada a $37^\circ C$ (arbitrariamente más de 10 minutos). Se pueden mantener las muestras durante varias horas en una mezcla de hielo picado y agua hasta su análisis.

3. Procedimiento para la actividad del t-PA

A. Sujetos

Se extraen las muestras de sangre de sujetos en reposo (20 minutos), sentados o echados (se debe elegir una de las dos posiciones). Se prefiere el ayuno (ver las observaciones), pero se permite un desayuno ligero sin grasa, té ni café.

Se sabe que existen efectos a corto plazo, producidos por el tabaco y las bebidas alcohólicas o con cafeína; para evitarlos, los sujetos deben abstenerse de fumar y de ingerir bebidas con cafeína durante un período mínimo de una hora antes y de tomar alcohol 24 horas antes de la punción venosa.

Se tienen que elegir y estandarizar cuidadosamente el tiempo o tiempos de extracción de sangre. Los sujetos deben tener un estilo de vida con un ritmo circadiano normal; se deben anotar las desviaciones.

B. Tubos

La sangre se puede recoger en tubos de plástico o silicónados que contengan anticoagulantes.

C. Anticoagulante

Se debe acidificar la sangre a un pH de aproximadamente 6 tan pronto como sea posible. Se puede usar un volumen de citrato, suplementado con ácido o ácido cítrico, o se pueden emplear los tubos existentes en el mercado.

D. Técnica de extracción de sangre

Se efectúa una punción venosa bien hecha y limpia (sin mover la aguja en el interior de la vena), empleando una estasia mínima (es aceptable la aplicación de un torniquete durante un período máximo de 2 minutos con +2 kPa, como máximo, para facilitar cada punción). Se pueden emplear tanto la técnica de flujo (suficiente) libre como la de vacío. Se descartan unos ml de sangre o no se emplea el primer tubo de vacío para este ensayo.

Después del llenado, se debe mezclar el contenido de los tubos invirtiéndolos 5 veces y se deben colocar en una mezcla de hielo picado y agua.

E. Preparación del plasma

Se centrifuga la sangre lo más pronto posible, pero no después de 30 minutos de la punción (ver avances futuros en las observaciones). Las condiciones mínimas son 1800×g y 30 minutos en una centrifuga preenfriada con un rotor de oscilación hacia fuera (temperatura fijada a +4° C).

Inmediatamente después de la centrifugación, se debe extraer cuidadosamente el plasma con una pipeta y se debe recoger en un tubo pequeño o vaso de precipitación (*beaker*). Dependiendo del ensayo que se desea realizar (ver observaciones), se vuelve a dar al plasma un suplemento de ácido clorhídrico (1 mol/l de HCl al plasma 1+15) para obtener un pH aproximadamente igual a 3.

Después de mezclar cuidadosamente el plasma reunido, se llenan los tubos etiquetados previamente para su conservación.

F. Congelación, almacenamiento y descongelación del plasma

Las alícuotas del plasma deben mantenerse congeladas. Se debe mantener una temperatura de mantenimiento

constante e inferior a -30° C (plasma con un pH=6) y preferiblemente a -70° C con el plasma a un pH de 3.

Se puede conseguir rápidamente la descongelación mediante un baño de agua a 37° C. Las muestras son retiradas después de un período fijo de 3 a 5 minutos (dependiendo del volumen de la muestra) y colocadas en una mezcla de hielo picado y agua hasta su análisis.

JUSTIFICACIONES Y OBSERVACIONES

A continuación se presenta un resumen de justificaciones y observaciones obtenidas por las contribuciones al Grupo de Trabajo por correo o en las discusiones. No se pretende hacer una revisión de la literatura disponible.

Las discusiones trataron sobre la recogida normal de la sangre y no incluyeron consideraciones específicas sobre la extracción de muestras después de realizar pruebas tales como oclusión venosa, goteo intravenoso de DDAVP, pruebas de ejercicio o terapia trombolítica.

También se prestó atención a los procedimientos para el estudio del PAI-1 plaquetario. Se han discutido varios procedimientos para estudiar el PAI-plaquetario, pero las experiencias y los datos todavía son demasiado limitados como para formarse una opinión. Los procedimientos para el estudio del PAI-1 plaquetario han sido detallados en tres contribuciones a estos procedimientos (5-7).

En el futuro parece muy deseable, desde un punto de vista práctico, definir un procedimiento unificado para recoger y manipular la sangre para todas las variables de t-PA y PAI-1. Sin embargo, éste no fue el objetivo actual del Grupo de Trabajo. No obstante, es muy posible que con los tres procedimientos ofrecidos se formule uno sólo para todas las variables discutidas. Esto se consigue simplemente seleccionando el procedimiento más exigente para cada apartado (A-F). En este momento sólo es necesario usar más de un tubo + reactivo (apartado C). En un futuro cercano se puede esperar que se estudiarán más los requisitos para la anticoagulación y la estabilización, obteniéndose posiblemente un tipo de «anticoagulante complejo» en los tubos de recogida.

Tipo de ensayo

El protocolo se centra en t-PA y PAI-1. Hay que destacar que el t-PA y el PAI-1 pueden interactuar continuamente, formando un complejo, y continúa haciéndolo *in vitro* a menos que se tomen medidas de prevención. A este respecto la trascendencia del tipo de ensayo es más manifiesta que en muchas otras situaciones en la hemostasia. Para el ensayo de actividad se requiere evidentemente la conservación de la situación *in vivo*; para un inmunoensayo o un ensayo de antígenos sólo se requiere esta conservación cuando un ensayo es específico para formas moleculares o si discrimina entre éstas, pero no es necesaria cuando se usa un ensayo llamado «gran total», que registra cuantitativamente la cantidad del antígeno estudiado, sin tener en cuenta si el antígeno está libre, modificado o en cualquier forma de complejo.

En la figura 1 se ilustran esquemáticamente tres posibles tipos de los ensayos arriba mencionados, para una situación teórica de una mezcla de t-PA libre, complejo t-PA*PAI-1 y complejo t-PA*PAI-2. El ensayo «gran total» determina todas las formas moleculares de t-PA con eficiencia igual (x) y, así, «cuenta» el número de moléculas de t-PA. El ensayo «específico» sólo registra una forma molecular de t-PA: en este ejemplo, el t-PA libre. También entran en esta categoría los ensayos específicos para los complejos t-PA*PAI-1 o t-PA*PAI-2. El ensayo «mixto» registra las diversas formas moleculares con una sensibilidad diferente (x, y, z).

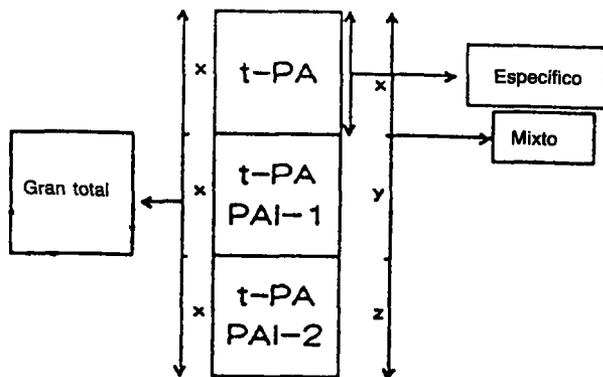


Figura 1. Ilustración de las diferencias entre los ensayos «mixtos», los ensayos de formas moleculares específicas y de «gran total», en una mezcla hipotética. Véase la explicación en el texto.

A. Sujetos

En cada estudio se debe elegir entre la posición sentada y supina, debido a una diferencia en el hematocrito. Además, la posición supina no produce cambios súbitos, sino graduales, del hematocrito y también del flujo sanguíneo del hígado (8), que concluyen sólo después de unos 20 a 30 minutos. Es necesario, por lo tanto, introducir estos períodos de tiempo antes de extraer las muestras.

En las cuatro variables discutidas se ha establecido una variación circadiana sinusoidal (9, 10). No se discute aquí el problema de seleccionar tiempos para caracterizar apropiadamente este patrón ni la detección adecuada de cambios (11). Es importante también que se anote cualquier desviación del estilo de vida del donante con respecto al ritmo circadiano y que, en estudios longitudinales, la conducta sea constante o se cambie intencionalmente (ver los resultados sobre trabajadores por turnos, 12).

Especialmente en el caso de la actividad del t-PA y también en el antígeno del t-PA (e indirectamente con los ensayos de PAI), se debe evitar la liberación de t-PA inducida por el estrés (si no es estudiada y estandarizada intencionalmente) y los sujetos deben estar en reposo durante un período mínimo de 20 minutos. La punción venosa es de por sí estresante y produce un aumento de la frecuencia cardíaca (13). El empleo de una cánula puede reducir estos problemas.

Además de una variedad de datos sobre el estilo de vida de los donantes con respecto a los efectos a largo plazo sobre los niveles de t-PA y PAI-1, también se conocen varios efectos a corto plazo. El hábito de fumar produce un aumento agudo del t-PA y el individuo no debe fumar durante un período mínimo de 60 minutos antes de la punción venosa, para evitar este efecto (13). Las bebidas con cafeína aumentan la actividad fibrinolítica de la sangre poco después (unas horas) de su consumo (14). El alcohol produce una reducción de la actividad fibrinolítica después de 1 a 6 horas (15, 16), debido a un aumento del PAI-1 (17), aunque también aumenta el antígeno del t-PA (17). Las comidas con carbohidratos, ricas en calorías, producen, después de aproximadamente 2 horas, un aumento de la actividad del PAI-1 (18).

Es posible evitar todos estos efectos mediante prescripciones adecuadas para los pacientes. Sin embargo, se puede aducir que tales prescripciones no deben producir una desviación excesiva de los hábitos normales

de los individuos porque se podría producir un efecto por el cambio o la abstinencia (19). Por lo tanto, las prescripciones sobre abstinencia deben ser lo más mínimas posibles para reducir este dilema y deben ser consideradas según cada nueva situación. Esto es especialmente aplicable en la extracción longitudinal de muestras durante el día y en las extracciones que no se hagan por la mañana. Es interesante señalar que, en su estudio sobre el efecto de la cafeína y el café, Joerg y cols. (6) hayan elegido continuar la ingestión de café y cafeína justo hasta el momento de la extracción de la muestra; en cambio, Veenstra y cols. (20) introdujeron una abstinencia desde la noche anterior. En el caso del consumo de alcohol, los efectos tardíos observados por el consumo nocturno sobre las variables matutinas (actividad del PAI-1) (17), también indican la prescripción de un período prolongado de abstinencia del alcohol, que podría ejercer teóricamente un efecto en los individuos habituados a un consumo moderado y regular de alcohol.

Es preferible el ayuno en las extracciones por la mañana, para evitar cualquier influencia sobre los resultados por los cambios en el volumen y distribución de la sangre durante la digestión (observación de E. Anglés-Cano y M.J. Larrieu), pero se puede tomar el desayuno ligero indicado. Es preferible que las otras comidas sean ligeras y uniformes; la extracción debe efectuarse al menos 1 hora después para reducir al mínimo los efectos a corto plazo. Hay que considerar cuidadosamente qué ingredientes podrían influir en las variables de t-PA y de PAI-1. Es preferible no realizar pruebas de ejercicio en ayunas para evitar efectos indeseables en algunos individuos (observación de I. Huisveld).

B. Tubos

Para los ensayos de fibrinólisis global y de otros tipos, no es deseable la actividad por contacto del vidrio (21) y se han prescrito tubos de vidrio siliconado o de plástico. Sólo en raras ocasiones se usan tubos, sólo de vidrio, para recoger la sangre. Se deben considerar los efectos potenciales sobre la estabilidad plaquetaria y la generación de enzimas de activación por contacto con actividad sobre los sustratos cromogénicos sintéticos empleados.

C. Anticoagulantes

En general, se emplea el citrato como anticoagulante para las variables de fibrinólisis. Se puede usar EDTA, pero se obtiene un hematocrito distinto debido a una diferencia en la deshidratación de los hematíes. Se ha observado que el plasma con EDTA da valores más elevados en los ensayos de antígeno de t-PA (observación de M. Ranby sobre el ensayo descrito en (3)) (observación de I. Wiczorek sobre el ensayo descrito en (22)).

Aunque el EDTA junto a los agentes estabilizantes plaquetarios es eficaz si no se mantiene la sangre durante un tiempo prolongado a temperatura ambiente (23), con el EDTA se obtiene una mayor liberación de plaquetas, especialmente cuando se emplea solo (23) y no se recomienda para la extracción de muestras para PAI-1.

Estabilización plaquetaria

Debido a la gran cantidad de PAI-1 contenida en el compartimiento plaquetario, una liberación relativamente pequeña de plaquetas puede producir rápidamente una adición significativa al PAI-1 plasmático.

Esto es especialmente cierto en la forma más abundante de PAI-1 en las plaquetas, la forma inactiva o latente y, por lo tanto, la sensibilidad del ensayo posterior de PAI-1 para esta forma determina la magnitud del efecto (23, 25-27). Se han observado, de hecho, diferencias en los efectos relacionados con los métodos de ensayo, que se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos.

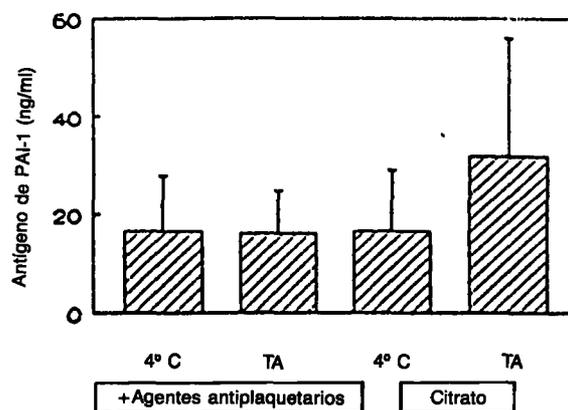


Figura 2. Antígeno libre de PAI-1 en el plasma (centrifugación, 30 minutos) de 6 sujetos con variación en la manipulación a 4° C o a temperatura ambiente (TA) y presencia de agentes antiplaquetarios. Datos I. Juhan-Vague.

Durante la manipulación son importantes las temperaturas bajas. Los datos obtenidos por I. Juhan-Vague muestran un aumento de los niveles de antígeno de PAI-1 (ensayo ELISA, PAI-1 libre, (24)) a temperatura ambiente (figura 2).

En otro conjunto de plasmas recogidos y manipulados de manera variable (a 4° C), el citrato normal mostró (en comparación con el citrato más agentes estabilizantes (Diatube®)) datos similares en el PAI-1 libre y total (n=12, ensayos ELISA, (24)), pero valores aumentados cuando se empleó un radioinmunoensayo (n=17) (25).

M. Stegnar y N. Vene obtuvieron datos que revelaron que su manipulación produce no sólo una tendencia no significativa a valores más altos en las muestras con citrato solo (en comparación a la adición de PGE1 y teofilina) evaluadas con los métodos Imulyse y Tint-Elize (medianas, 6,7 en comparación con 6,2, Tint-Elize, y 6,1 en comparación con 5,3 ng/ml, Imulyse; n=9).

Los datos de E. Eriksson (figura 3) ilustran además que se debe evitar la temperatura ambiente incluso cuando las plaquetas estén estabilizadas y cuando los períodos de manipulación sean más prolongados.

Así, se pueden comprender los diferentes datos sobre los efectos de la estabilización plaquetaria y ésta tiene poca importancia en el caso de una manipulación cuidadosa de las muestras en la investigación y cuando el ensayo empleado sea relativamente insensible al PAI-1 latente o inactivo. Sin embargo, es aconsejable la estabilización cuando no sea posible aplicar procedimientos rigurosos y cuando se espere que la estabilidad de las plaquetas sea variable. Se puede argumentar además que, en todos los casos en que se registre un cambio en el antígeno o en la actividad del PAI-1 en el plasma, es aconsejable hacer una comprobación para determinar si podría ser debida a (un cambio en) la liberación de plaquetas *in vitro*. Según este argumento, podría ser práctico emplear siempre procedimientos de estabilización plaquetaria en lugar de repetir la extracción o de comprobar en las muestras la ausencia de otros productos de liberación de plaquetas (p. ej., tromboglobulina, que sólo da información cuando no hay presencia de productos circulantes *in vivo*).

Se ha encontrado que los tubos Thrombotect® contienen una sustancia inhibitoria del t-PA. Esta sustancia demuestra tener un comportamiento similar al PAI-1 en la prueba de actividad del PAI-1 de Verheijen y cols. (28) (Kluft C. y cols., no publicado).

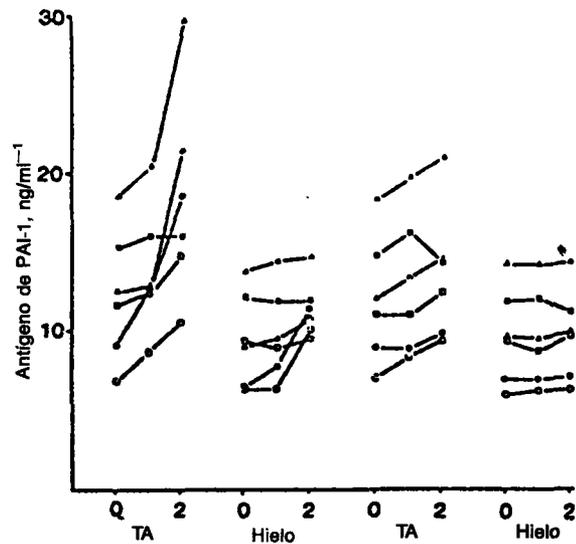


Figura 3. Efectos del almacenamiento de sangre sobre el antígeno de PAI-1 en plasma recogido. Se recogió sangre de 6 pacientes en tubos *vacutainer* con 1/10 de volumen de citrato (0,13 mol/l de citrato de sodio) o CTAD (0,11 mol/l de ácido cítrico, 15 mmol/l teofilina, 3,7 mmol/l adenosina, 0,198 mol de dipiridamol: Diatube®).

Los tubos preenfriados se mantuvieron en hielo; los tubos a temperatura ambiente se mantuvieron a esta temperatura (TA) durante horas y se centrifugaron para obtener plasma (200 g, 4° C, 20 minutos). Antígeno de PAI-1 ensayado por Tintelize, Biopool, Suecia. Datos de Eriksson, 1989. Activador e inhibidor del plasminógeno tisular en la sangre y los tejidos. Tesis.

Inactivación del PAI-1 para el ensayo de t-PA

Para evitar la inactivación de t-PA por el PAI-1 *in vitro*, especialmente cuando el PAI-1 está elevado (29), es necesario detener inmediatamente la reacción de inhibición. Esto sólo se consigue de manera eficaz recogiendo directamente la sangre en un medio ácido (29-30). Se debe conseguir al final un pH de aproximadamente 6 (29, 30).

No es suficiente detener la reacción en la sangre o el plasma solamente, puesto que durante el ensayo (también después del fraccionamiento de euglobulina (31)), el pH y la temperatura vuelven a aumentar, reduciendo la recuperación de la actividad del t-PA (29, 30). Un método consiste en una fuerte dilución de la muestra (30); otro, en una inactivación irreversible adicional del PAI-1 reduciendo más el pH (aproximadamente a 3) (29, 32).

D. Técnica de extracción de la sangre

Previamente la ECAT recomendó la extracción por flujo libre (1), pero posteriormente se han adoptado técni-

cas de vacío (2). El uso de una cánula reduce los efectos del estrés causado por las punciones venosas (13). Se ha demostrado que, para el PAI-1, las extracciones repetidas de sangre (10 muestras con un intervalo de 30 segundos) dieron resultados similares (33). Las prolongadas discusiones del Grupo de Trabajo dieron lugar a la aceptación de una estasia mínima para facilitar una punción cuando sea necesario, definida como la aplicación durante un máximo de 2 minutos de un torniquete, con una presión máxima de +2 kPa. Este requisito se relaciona en su mayor parte con un aumento del t-PA, inducido por otros medios.

En teoría no es necesario el enfriamiento de la sangre y el plasma para el antígeno de t-PA cuando se emplea un ensayo «gran total». Igualmente, la incubación de sangre o plasma acidificado para el ensayo de actividad del t-PA a temperatura ambiente durante unas horas no parece ocasionar pérdidas importantes de la actividad (30). Se aconseja, sin embargo, la manipulación, a 4° C, de la sangre y el plasma para medir la actividad del t-PA (también en vista de los beneficios de una centrifugación rápida, ver más adelante), hasta que se disponga de datos en sentido contrario.

«Congelación» de la situación del PAI-1

Para la estabilización de la situación del PAI-1, el procedimiento suministrado no ha sido optimizado para evitar la formación de complejos con el t-PA endógeno. En los ensayos de actividad del PAI-1 empleados corrientemente, la actividad del PAI-1 titulada es la que permanece después de la actividad neutralizada (*in vitro*) por el t-PA endógeno. En las muestras de sangre recogidas por la tarde y después de los procedimientos y pruebas que aumentan el t-PA circulante, los efectos del t-PA endógeno se vuelven significativos; en cambio, los efectos por lo general son relativamente pequeños debido a la situación normal de un exceso del PAI-1 activo sobre el t-PA activo.

Se puede tener en cuenta la formación de complejos entre el PAI-1 y el t-PA endógeno en inmunoensayos que no discriminen entre el PAI-1 libre y los complejos PAI-1*t-PA (4). Esta especificación es esencial en tales ensayos a fin de usar el procedimiento presentado; de otro modo, la extracción de sangre es mucho más compleja.

Aunque en la mayoría de los ensayos de actividad y de antígeno del PAI-1 se puede tener en cuenta la formación de complejos entre el t-PA endógeno y el PAI-1,

se enfría la sangre para reforzar la estabilización plaquetaria y no se debe mantener el plasma durante períodos prolongados a 37° C, puesto que el PAI-1 se convierte espontáneamente de una forma activa a una inactiva, con una vida media de aproximadamente 2 horas a 37° C (34). Con temperaturas más bajas, la velocidad de conversión se reduce significativamente, con un factor de 5 por cada 10 grados de disminución de la temperatura (Kluft C., no publicado). Varios ensayos de antígeno del PAI-1 son bastante sensibles a la conversión de PAI-1 activo a inactivo (4).

E. Preparación del plasma

Ver (D) sobre las restricciones en la temperatura y el tiempo de incubación de las muestras.

El gran contenido de PAI-1 en las plaquetas requiere su eliminación eficaz. Para una eliminación máxima de plaquetas debe ser adecuada una centrifugación (33). En la tabla 1 se ilustra la importancia de la centrifugación.

Tabla 1. Efectos de la centrifugación de sangre sobre el contenido de antígeno de PAI-1 en el «plasma».

Centrifugación	Antígeno de PAI-1 (ng/ml)	
	10 min 2.000×g	30 min 2.000× g
Antes de la oclusión venosa:		
Método I	13,9	6,7 (p<0,05)
Método II	10,6	6,1 (p<0,05)
Después de 20 minutos de oclusión venosa:		
Método I	15,1	4,3 (p<0,05)
Método II	11,6	5,1 (p<0,01)

Sangre recogida en citrato-Na. Método I = Tintelize; Método II = Imulyse de Biopool AB, Suecia. Medianas de 9 sujetos. Datos de M. Stegnar y N. Vene.

La presencia de residuos plaquetarios cerca del menisco de la parte superior del tubo de sangre centrifugada indica la aspiración de plasma sólo de la capa intermedia de plasma (observación de C.A. Ludlam).

Para la actividad del t-PA se está investigando la centrifugación de corta duración con velocidad alta, que parece beneficiosa (29, tabla 2).

F. Congelación, almacenamiento y descongelación del plasma

La descongelación y posterior enfriamiento de 600 µl de plasma en tubos de plástico en un baño de agua y

Tabla 2. Efecto de una centrifugación rápida y a velocidad alta sobre la evaluación de la actividad del t-PA en 5 pacientes (datos de E. Eriksson).

Recogida* y centrifugación	Actividad del t-PA en el plasma después de la oclusión venosa (UI/ml)				
	pac 1	pac 2	pac 3	pac 4	pac 5
Estabilyte+8000 g/2 min	1,8	11,6	2,4	15,3	3,3
Estabilyte+2000 g/20 min	2,0	10,8	1,6	12,5	3,0
Citrato+8000 g/2 min	0,8	10,8	1,0	3,3	1,2

* El plasma se acidifica en todos los casos y se congela; citrato=0,13 mol/l; ver los métodos en (23).

una mezcla de hielo y agua, son procesos rápidos, como se muestra en la figura 4.

La congelación y descongelación repetidas pueden aumentar el escape de PAI-1 de las plaquetas residuales en el plasma (observación de E. Eriksson).

RESUMEN

Los procedimientos de recogida y manipulación de sangre son diferentes según las diversas variables presentes en la hemostasia y tienden a cambiar gradualmente a medida que avanzan los conocimientos y los métodos. El Grupo de Trabajo ha reunido información sobre los antecedentes de los procedimientos y ha discutido los requisitos mínimos para la evaluación específica de t-PA y de PAI-1. El procedimiento general de ECAT fue tomado como referencia y se modificó según las necesidades. Se resume la información discutida sobre los antecedentes y se proporcionan modificaciones en forma de procedimientos de los requisitos mínimos de cada variable.

Palabras clave: Recogida de sangre, variables preanalíticas, activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1).

BIBLIOGRAFIA

1. Duckert F, Haverkate F. The assay procedures. ECAT 1984; no. 2: 1-14.
2. ECAT Blood collection and performance of haemostasis assays. 989 Appendix V: pp 14-17.
3. Ranby M, Bergsdorf N, Nilsson T, Mellbring G, Winblad B, Bucht G. Age dependence of tissue plasminogen activator concentration in plasma, as studied by an improved enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chem 1986; 32: 2160-2165.
4. Kluff C, Jie AFH. Comparison of specificities of antigen assays for plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Fibrinolysis 1990; 4: (Supp 2), 136-137.
5. Griep EN, van der Zee MC, den Ottolander GJH. Determination of plasminogen activator inhibitor in human plasma and blood platelets and its clinical relevance. Fibrinolysis 1990; 4: (Supp 2), 141-144.

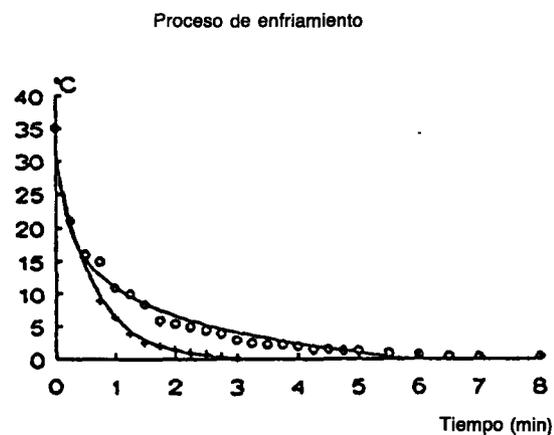
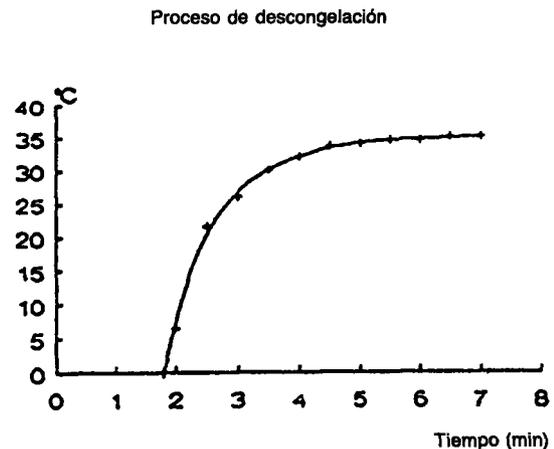


Figura 4. Temperatura en una muestra de 600 µl de plasma durante la descongelación y enfriamiento. (+) representa un enfriamiento reforzado con agitación. (Datos de P. Turion y G. Dooijewaard.)

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al líder del proyecto de ECAT (Dr. F. Haverkate) por habernos proporcionado los procedimientos de ECAT para la recogida y manipulación de la sangre, y a los colegas que proporcionaron datos para esta comunicación y todos los participantes que contribuyeron en las discusiones.

6. **Joerg M, Huber K, Peska M, Binder BR.** Effect of caffeine intake on platelet antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 71-73.
7. **Booth NA, Croll A, Bennett.** The activity of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) of human platelet. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 138-140.
8. **De Boer A, Kluft C, Cohen AF.** Life style and blood fibrinolytic activity: A comment on clearance of plasminogen activators. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 61-63.
9. **Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR et al.** Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988; 62: 635-637.
10. **Grimaudo V, Hauer J, Bachmann F, Krulthof EJO.** Diurnal variation of the fibrinolytic system. *Thromb Haemostas* 1988; 59: 495-499.
11. **Kluft C, Andreotti F.** Consequences of the circadian fluctuation in plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) for studies on blood fibrinolysis. *Fibrinolysis* 1988; 2 Supp 2: 93-95.
12. **Peternel P, Stegnar M, Salobir U, Salobir B, Keber D, Vene N.** Shift work and circadian rhythm of blood fibrinolytic parameters. *Fibrinolysis* 1990; 4: Supp 2. 113-115.
13. **Allen RA, Kluft C, Brommer EJP.** Acute effect of smoking on fibrinolysis: increase in the activity level of circulating extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Eur J Clin Invest* 1984; 14: 354-361.
14. **Samarrae WA, Truswell AS.** Short-term effect of coffee on blood fibrinolytic activity in healthy adults. *Atherosclerosis* 1977; 26: 255-260.
15. **Fearnley GR, Ferguson J, Chakrabarti R, Vincent CT.** Effect of beer on blood fibrinolytic activity. *Lancet* 1960; i: 184-185.
16. **Nilsson IM, Bjorkman SE, van Studnitz W, Hallen A.** Antifibrinolytic activity of certain pectins. *Thromb Diath Haemorrh* 1961; 6: 177-187.
17. **Veenstra J, te Wierik E, Kluft C.** Alcohol and fibrinolysis. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 64-68.
18. **Medvescek M, Keber D, Stegnar M, Borovnicar A.** Plasminogen activator inhibitor 1 response to a carbohydrate meal in obese subjects. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 89-90.
19. **Emels JJ.** Effect of diet on fibrinolytic components. An introduction. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 59-60.
20. **Veenstra J, Kluft C, Ockhuizen Th et al.** Effects of four days of moderate wine and coffee consumption on fibrinolysis and platelet aggregation. *Fibrinolysis* 1990; 4: 215-220.
21. **Allen RA, Brommer EJP, Kluft C.** Blood sampling techniques for fibrinolytic studies: comparison of Vacutainer® and traditional techniques. *Thromb Res* 1981; 23: 197-199.
22. **MacGregor IR, MacDonald S, Dawes J, Micklem LR, James K.** A monoclonal antibody enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) directed towards a fibrin binding region of tissue-type plasminogen activator. *Fibrinolysis* 1987; 1: 247-252.
23. **Eriksson E, Tengborn L, Risberg B.** The effect of various anticoagulant/antiplatelet mixtures on determination of plasminogen activator inhibitor, platelet proteins and haemostasis parameters. *Thromb Haemostas* 1989; 61: 511-516.
24. **Declerck PJ, Verstreken M, Collen D.** Measurement of different forms of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) using various monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 132-133.
25. **Juhan-Vague J, Alessi MC, Fossat C, Declerck PJ, Kruit-hof EKO.** Plasma determination of plasminogen activator inhibitor-1 antigen must be performed in blood collected on antiplatelet/anticoagulant mixture. *Thromb Haemostas* 1987; 58: 1096.
26. **Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR.** Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol* 1988; 70: 327-333.
27. **Rydzewski A, Takada Y, Takada A.** Determination of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in plasma using two different anticoagulants and methods. *Thromb Res* 1989; 55: 285-289.
28. **Verheijen JH, Chang GTG, Kluft C.** Evidence of the occurrence of a fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemostas* 1984; 51: 392-395.
29. **Wejkum L, Rosen S, Sorskog L, Brandt B, Chmielewska J.** Blood sampling and determination of tissue plasminogen activator activity with Coa-set® t-PA. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 152-154.
30. **Ranby M, Sundell IB, Nilsson TK.** Blood collection in strong acid citrate anticoagulant used in study of dietary influence on basal tPA activity. *Thromb Haemostas* 1989; 62: 917-922.
31. **Kluft C, Jie AFH.** Underestimation of tissue-type plasminogen activator activity in plasma when euglobulin fractions are used for assessment. *Fibrinolysis* 1986; Supp 1: abstr 147.
32. **de Maat MPM, Kluft C, de Boer K, Knot EAR, Jie AFH.** Acid treatment of plasma for the inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Thromb Res* 1988; 52: 425-430.
33. **Sidelmann J, Gram J.** The influence of venepuncture, mixing and separation of blood on the measurement of thrombin-antithrombin-III-complex and plasminogen activator inhibitor. *Fibrinolysis* 1990; 4: (Supp 2), 124-126.
34. **van Hinsbergh VVM, Bertin RM, van Wijngaarden A, van Tilburg NH, Emels JJ, Haverkate F.** Activated protein C decreases plasminogen activator inhibitor activity in endothelial cell conditioned medium. *Blood* 1985; 65: 444-451.