

**INFLUENCIA DE LOS INHIBIDORES ENDÓGENOS DE LA
FIBRINOLISIS SOBRE EL TRATAMIENTO
TROMBOLÍTICO DEL ICTUS CON t-PA**

Tesis defendida por

Marc Ribó Jacobi

Para aspirar al

Grado de Doctor en Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

2004

Esta tesis doctoral es el resultado del trabajo desempeñado en los últimos años por la Unidad Neurovascular del Hospital Vall d'Hebron. Todos y cada uno de sus miembros incluyendo al personal de la Unidad de Ictus, al Laboratorio de Investigación Neurovascular, al Laboratorio de Hemodinámica Cerebral y a la Unidad de Estadística han sido imprescindibles para lograr estos resultados. Además quisiera destacar el ambiente de cordialidad y compañerismo existente en la Unidad que tanto facilita el trabajo y que seguro que también ha contribuido en gran parte a los éxitos que este grupo de trabajo ha obtenido en los últimos tiempos.

Por último tengo que agradecer a los directores de la tesis Dres. José Álvarez-Sabín y Joan Montaner su apoyo y sus valiosos consejos.

Finalmente, Gracias a todos los que me quieren y me ayudan.

INFLUENCIA DE LOS INHIBIDORES ENDÓGENOS DE LA FIBRINOLISIS SOBRE EL TRATAMIENTO TROMBOLÍTICO DEL ICTUS CON t-PA

ÍNDICE

1. Introducción

1. Infarto cerebral y tratamiento fibrinolítico

Epidemiología

Tratamiento fibrinolítico y sus limitaciones.

2. Doppler transcraneal

Principios generales

Diagnóstico de las oclusiones de las arterias cerebrales

Monitorización continua y recanalización arterial

3. Inhibidores endógenos de la fibrinólisis

Potencial Fibrinolítico Global

PAI-1

Lipoproteína A

TAFI

Homocisteína

2. Objetivos

3. Métodos

1. Selección de pacientes
2. Variables clínicas
3. Protocolo de Doppler Transcraneal
4. Neuroimagen: Tomografía Computarizada y Resonancia Magnética
5. Suero: Obtención de muestras, conservación y análisis

4. Copia de las publicaciones.

Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 1146-51.

Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2004; 35: 2123-7.

5. Síntesis de los resultados y discusión

1. **Concentración plasmática de los inhibidores de la fibrinólisis en la fase hiperaguda del ictus isquémico.**
2. **Influencia sobre la recanalización de la ACM.**
3. **Influencia sobre la transformación hemorrágica**

6. Conclusiones

7. Anexo

8. Bibliografía

1. Introducción

1. Infarto cerebral y tratamiento fibrinolítico

Epidemiología

El ictus es la primera causa de discapacidad en la población adulta, la primera causa de mortalidad en la mujer y la segunda en el varón. Constituye uno de los problemas más importantes del sistema sanitario, tal como se puede deducir de las cifras que comentamos a continuación.

La incidencia anual de ictus es de 150 a 200 casos por cada 100.000 habitantes. Ello significa que en una ciudad como Barcelona cada día entre 10 y 12 personas van a sufrir por primera vez un ictus, lo que representa unos 4.000 nuevos ictus al año. Si nos fijamos en la prevalencia, entre 500 y 600 personas por cada 100.000 habitantes han sufrido en uno u otro momento un ictus. En España ocurren más de 80.000 nuevos ictus al año y la prevalencia es de unos 300.000 casos. A pesar de la reducción de un 10-15% en el porcentaje de mortalidad observado en España durante la década 1985-1994, el ictus es en la actualidad la primera causa de mortalidad por entidades específicas, representando el 11,5% del total de fallecimientos en nuestro país. Además, representa la primera causa de discapacidad física en las personas adultas y por tanto consume una parte importante del gasto sanitario y de prestaciones sociales.

El ictus en territorio de la arteria cerebral media (ACM) constituye el infarto territorial más frecuente y uno de los que conlleva mayor morbi-mortalidad. En contraste con su elevada frecuencia e impacto en la salud pública, la oferta terapéutica específica se limita a la inducción de la recanalización precoz de la arteria ocluida con fibrinolíticos, que sólo es efectiva si se produce dentro de las primeras horas tras el inicio de los síntomas (Adams, Brodt et al. 1996).

Tratamiento fibrinolítico y sus limitaciones.

El tratamiento fibrinolítico con activador del plasminógeno tisular (t-PA) está dirigido a conseguir una recanalización precoz del vaso evitando así la necrosis completa de la zona comprometida. Hoy en día es el único tratamiento aprobado en la fase aguda del ictus (1995, NINDS). Su uso al principio controvertido se está generalizando en todo el mundo y hoy en día nadie duda de su eficacia si es administrado dentro de las tres primeras horas tras el inicio de los síntomas por un neurólogo especializado.

En efecto, el tratamiento con t-PA endovenoso potencia la actividad fibrinolítica intrínseca acelerando la disolución del trombo y consiguiendo así una mayor y más precoz tasa de recanalización de la arteria afectada (Christou, Alexandrov et al. 2000; Alexandrov, Burgin et al. 2001; Molina, Montaner et al. 2001; Molina, Montaner et al. 2001). De esta manera se logra una reducción significativa del déficit neurológico en la fase aguda y de la discapacidad a largo plazo.

Pese a sus innegables ventajas, el tratamiento con t-PA del ictus isquémico no siempre presenta la eficacia deseada. Alrededor de un 50% de los pacientes tratados no recanalizan o lo hacen demasiado tarde, en especial los que presentan una oclusión de la arteria carótida interna o de la porción proximal de la ACM que únicamente lo hacen en un 10% y un 25% de los casos respectivamente (Alexandrov, Burgin et al. 2001; Christou, Felberg et al. 2002; Molina, Montaner et al. 2004). La ausencia de recanalización temprana constituye un fracaso terapéutico puesto que la mejoría clínica se debe a la reperusión precoz de la penumbra isquémica, antes de que se establezca un daño celular irreversible.

Los factores que determinan la resistencia a la recanalización siguen siendo una incógnita. ¿Porqué 2 pacientes con los mismos factores de riesgo, igual etiología, localización y tiempo de evolución de la oclusión arterial presentan respuestas diferentes al t-PA? (figura 1).

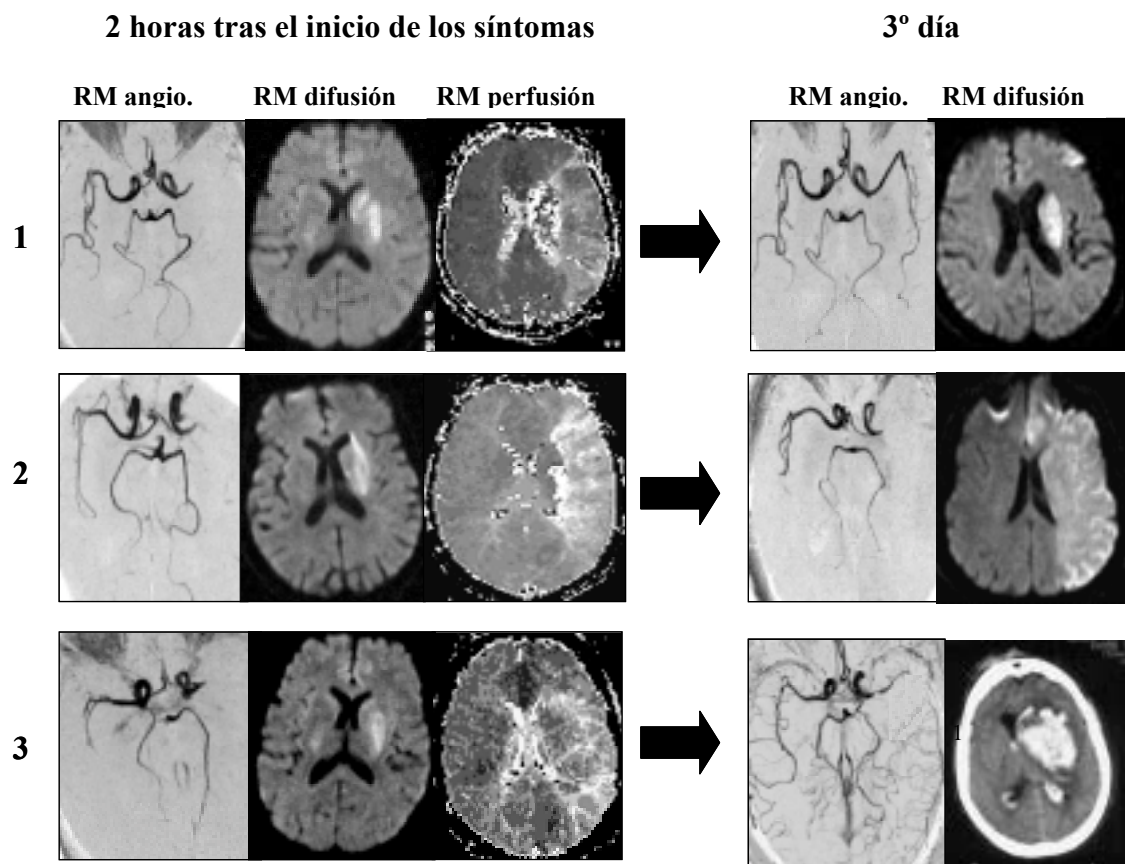


Figura 1: muestra 3 pacientes con características similares en el momento de su llegada a urgencias, oclusión proximal de la ACM, pequeña lesión en las secuencias de difusión y extenso defecto de perfusión en todo el territorio de la ACM. Pese a recibir el mismo tratamiento la evolución fue muy dispar: 1- recanalización completa sin crecimiento de la lesión, 2- ausencia de recanalización y infarto extenso en todo el territorio de la ACM, 3- recanalización parcial con transformación hemorrágica muy extensa.

Experimentalmente se han identificado muchos factores potencialmente capaces de influir sobre la cascada de reacciones moleculares que conducen a la degradación fibrinolítica de un trombo. Por desgracia, en la actualidad seguimos sin conocer con exactitud cuales son aquellos que condicionan una peor respuesta al t-PA en el ictus, retrasando la recanalización arterial en condiciones reales.

Transformación hemorrágica.

La complicación más frecuente del tratamiento fibrinolítico del ictus es la aparición de una transformación hemorrágica cerebral en la zona afectada (1997; NINDS). Al contrario de lo que pueda parecer no se trata siempre de un efecto adverso de t-PA y es fundamental distinguir entre los diferentes tipos de infarto hemorrágico o hematoma parenquimatoso, puesto que se asocian a evoluciones clínicas muy diferentes (figura 2). Mientras los infartos hemorrágicos (HI: pequeños piqueteados hemáticos en el seno del área afectada) se asocian con reperusión precoz de un parénquima todavía viable y buena evolución clínica, los hematomas parenquimatosos (PH: grandes colecciones de sangre con efecto de masa) se relacionan con reperusión tardía sobre un lecho vascular friable, y mal pronóstico que en muchas ocasiones es de muerte (Hacke, Kaste et al. 1995; Molina, Montaner et al. 2001; Molina, Alvarez-Sabin et al. 2002).

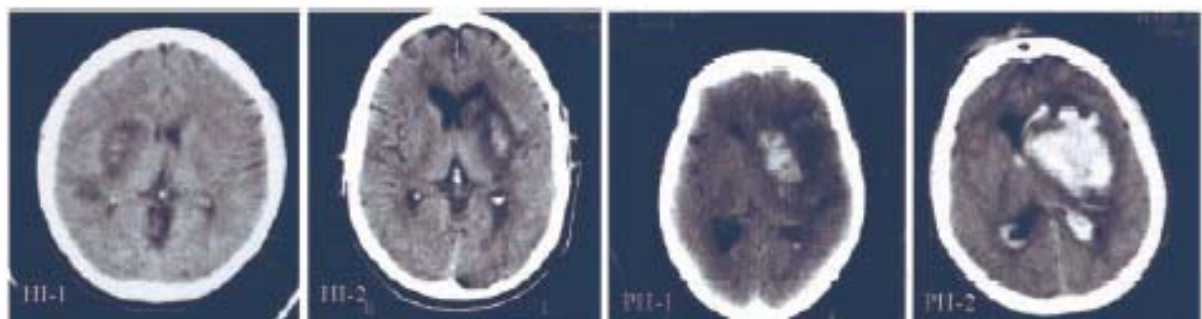


Figura 2: clasificación de las transformaciones hemorrágicas según los criterios del estudio ECASS en infarto hemorrágico tipo (HI-1 o HI-2) y hematoma parenquimatoso (PH-1 o PH-2)

El principal efecto adverso del tratamiento del ictus con t-PA es la transformación hemorrágica sintomática. Aunque su frecuencia oscila sólo entre el 6 y el 14% según las series, se trata probablemente la causa que más ha contribuido a que la terapia trombolítica del ictus no esté ampliamente difundida en la práctica clínica (Heuschmann, Berger et al. 2003). Pese a estar sobradamente demostrado que tras la

administración de t-PA las expectativas de presentar una mejoría clínica son elevadas, la pequeña probabilidad de que el paciente sufra una transformación hemorrágica sintomática acostumbra a frenar al médico responsable en cuya conciencia sigue pesando el viejo principio de *primum non noscere*. Al igual que la resistencia a la recanalización, los factores que determinan la aparición de una transformación hemorrágica sintomática no están bien definidos (figura 1) (Alexandrov, Black et al. 1997; Larrue, von Kummer et al. 1997; Montaner, Molina et al. 2003).

La identificación de estos factores permitiría valorar el riesgo de sangrado y la probabilidad de conseguir una recanalización precoz en cada paciente. En ambos casos el médico dispondría de una información valiosísima al enfrentarse a la tantas veces recurrente pregunta de tratar o no tratar con t-PA. La toma de decisiones con mejor conocimiento de causa permitiría aumentar la confianza del médico y generalizar así de forma segura el uso de t-PA. Del mismo modo la predicción de los acontecimientos puede ayudar a individualizar el tratamiento, ajustando la dosis o recurriendo a técnicas más agresivas como las endovasculares o la combinación de fármacos en los casos en los que se prevea una resistencia a la recanalización.

2. Doppler transcraneal.

1. Principios generales

El Doppler transcraneal se ha convertido en los últimos años en una herramienta indispensable en la atención urgente del paciente con un ictus isquémico (Zanette, Fieschi et al. 1989). Permite de forma rápida y no invasiva el estudio de la circulación cerebral en la cabecera del enfermo tantas veces como sea necesario. La exploración puede hacerse en la misma sala de Urgencias mientras se toman las constantes del enfermo o se realiza la extracción para el análisis de sangre. A través de las diferentes ventanas óseas (temporal, transforaminal occipital, y orbital) el explorador experimentado puede en pocos minutos identificar una oclusión de cualquiera de las principales arterias intracraneales y evaluar el estado de la circulación colateral (Kaps, Damian et al. 1990; Ley-Pozo and Ringelstein 1990; Demchuk, Christou et al. 2000; Ribo, Garami et al. 2004).

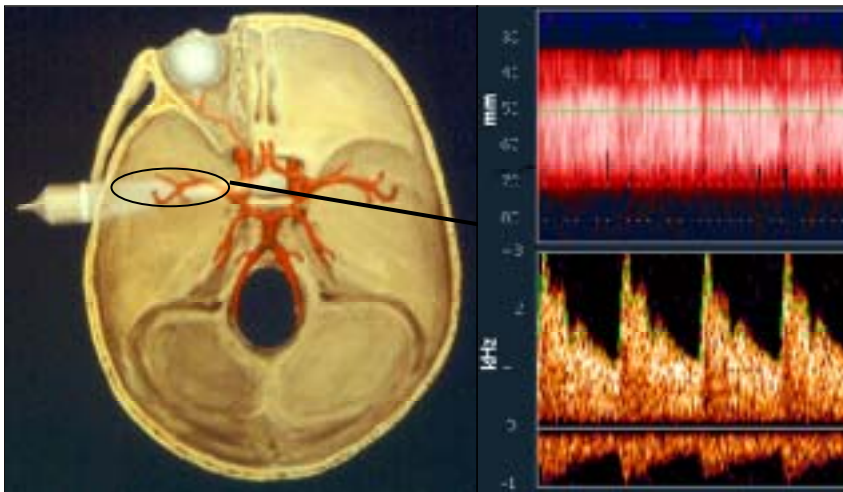


Figura 2: A través de las diferentes ventanas óseas se puede identificar el flujo en las principales ramas del polígono de Willis.

2. Diagnóstico de las oclusiones de las arterias cerebrales

La escala de TIBI (Thrombolysis In Brain Ischemia) define unos patrones de flujo que permiten localizar con gran precisión el punto exacto en que se encuentra la oclusión arterial (Demchuk, Burgin et al. 2001). Mediante la fijación de la sonda con unos cascos especialmente diseñados se puede monitorizar de forma continua la oclusión de la arteria cerebral media y determinar el momento preciso en que se produce la recanalización arterial (Alexandrov, Demchuk et al. 2000; Christou, Alexandrov et al. 2000; Christou, Felberg et al. 2002).

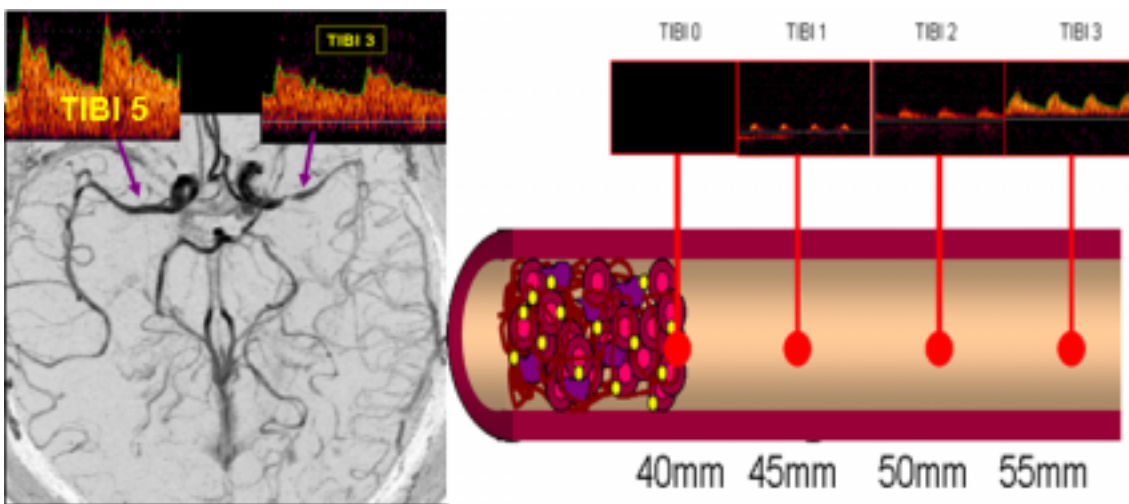


Figura 3: la imagen de la izquierda muestra un flujo normal en la ACM derecha (TIBI 5) y un flujo correspondiente a una oclusión distal en la ACM izquierda. A la derecha observamos como varían los patrones de flujo en función de la distancia relativa al trombo a la que insonamos.

Los beneficios de los ultrasonidos no acaban aquí, estudios recientes han demostrado que el haz de ultrasonidos es capaz de producir microcavitaciones en las cadenas de fibrina creando un micro flujo en el seno del trombo (Lauer, Burge et al. 1992; Tachibana 1992; Blinc, Francis et al. 1993). Esto potencia las acción del t-PA, favoreciendo la penetración del fármaco que cataliza las reacciones fibrinolíticas. Se logra de este modo incrementar y anticipar sensiblemente la recanalización arterial consiguiendo disminuir el volumen de tejido infartado con el correspondiente beneficio clínico final (Alexandrov

2004). Esperanzadores también son los indicios que apuntan hacia el empleo de agentes de eco-contraste, consituidos por microburbujas estabilizadas de aire, que favorecerían más aún el efecto de los ultrasonidos (Cintas, Nguyen et al. 2004; Molina, Ribo et al. 2005).

Inhibidores endógenos de la fibrinólisis.

La extensión del tejido dañado y el pronóstico clínico de un evento trombótico arterial están determinados por el balance de dos procesos opuestos: la formación y degradación del trombo. Los trombos arteriales suelen generarse sobre la pared endotelial dañada donde turbulencias de un flujo anómalo favorecen su crecimiento, o en condiciones de estasis sanguínea como las que se encuentran en las cavidades cardíacas en condiciones patológicas de arritmias o valvulopatías. La cascada de la coagulación se activa en las fases precoces del proceso. La trombina generada amplifica la agregación plaquetaria inicial y confiere estabilidad estructural al nuevo trombo mediante la formación de una red de fibrina. De todos modos aún en respuesta al más trombogénico de los estímulos, como el daño endotelial de vasos profundos, la formación de un trombo oclusivo requiere un tiempo considerable. Esto se debe a que el crecimiento y estabilización de la masa de plaquetas y fibrina debe superar el potente poder disruptivo mecánico (elevada presión arterial) y enzimático (fibrinólisis) que limita la progresión del trombo. Una vez establecida la oclusión arterial, únicamente la fibrinólisis es capaz de reestablecer el flujo sanguíneo.

La fibrinólisis es una compleja sucesión de reacciones entre moléculas activadoras e inhibidoras que culmina en la degradación de la fibrina. La interacción de todas estas moléculas en su conjunto determina el llamado potencial fibrinolítico global (PFG). El PFG es un valor dinámico que presenta oscilaciones tanto circadianas como con la edad. Existen muchos factores capaces de influir sobre el PFG, en especial en las primeras horas tras el establecimiento del ictus en las que existe una importante liberación de algunas de estas moléculas al torrente circulatorio, aunque con grandes diferencias

interindividuales (Zunker, Schick et al. 1999; Collet, Montalescot et al. 2003; Montaner, Ribo et al. 2003; Ribo, Montaner et al. 2004). Es probable que estas diferencias sean responsables del éxito o fracaso del tratamiento fibrinolítico tanto en lo que respecta a la recanalización precoz como a la transformación hemorrágica sintomática.

La determinación de la actividad fibrinolítica de cada paciente ha sido durante años causa de polémica al existir diferentes métodos que en general requieren un proceso largo y tedioso. Existen métodos capaces de medir el potencial fibrinolítico global pero son procedimientos de gran complejidad y clásicamente sus resultados se han considerado poco reproductibles y por tanto poco fiables. Una aproximación interesante al potencial fibrinolítico global consiste en la determinación individual de las principales moléculas que intervienen en el proceso de degradación del trombo. Además de determinar los niveles plasmáticos de cada una de estas moléculas en la fase aguda del ictus (hasta ahora desconocidos), se logra así identificar el peso específico de cada una de ellas en el éxito o fracaso del tratamiento (resistencia a la recanalización y transformación hemorrágica sintomática). Estos datos permitirían conocer los mecanismos patofisiológicos y en última instancia identificar aquellas moléculas sobre las que se podría actuar para incrementar la eficacia y seguridad del tratamiento trombolítico del ictus.

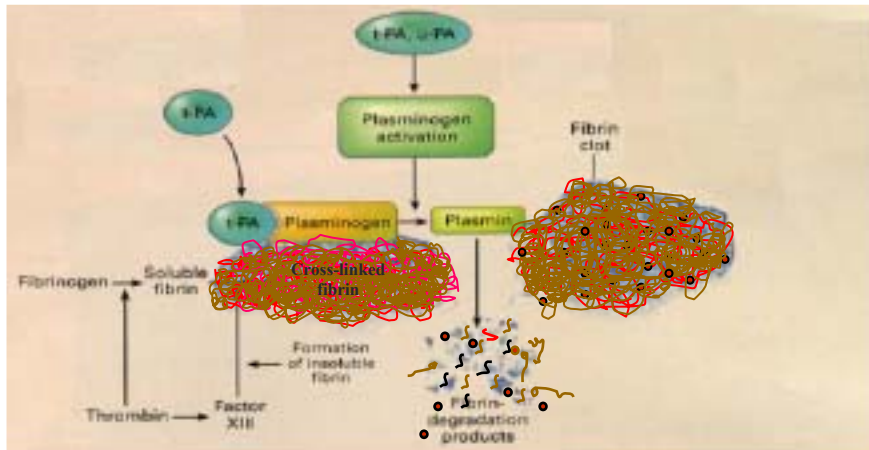
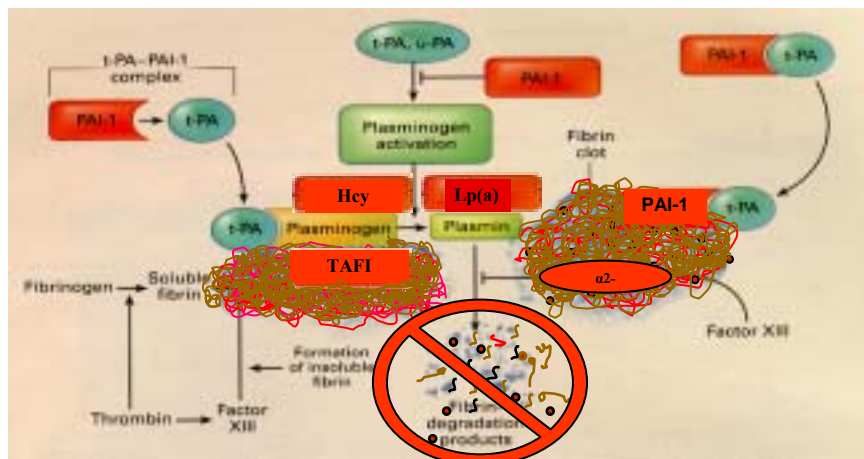


Figura 4.

A. Esquema de la vía de fibrinolisis que conduce a la degradación del trombo.



B. Diferentes puntos en los que pueden interferir algunos de los inhibidores endógenos de la fibrinolisis.

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. PAI-1

PAI-1 (45 kDA) es una glicoproteína de cadena única (379 a 381 aminoácidos) unida a un péptido señal (23 aminoácidos) que indica que se trata de una proteína secretada (Gils and Declerck 2004). Presenta tres potenciales puntos de glicosilación. Pertenece a la familia de los *inhibidores* de las *serin proteasas* también llamadas *serpinas*. Las serpinas representan alrededor de un 10% del total de las proteínas plasmáticas y se dividen fundamentalmente en dos grupos: las serpinas inhibitoras de proteasas (PAI-1) y las no inhibitoras. Las pertenecientes al primer grupo forman un complejo mediante una unión covalente con la proteasa a inhibir correspondiente. Durante este proceso la serpina se fracciona limitándose así el poder inhibitor a un solo encuentro con la proteasa diana. De este modo PAI-1 se une a t-PA de forma estable e induce un cambio conformacional que limitará su poder activador del

plasminógeno. PAI-1 ejerce un potente y rápido efecto inhibitor sobre t-PA y u-PA pero este no es específico; también actúa sobre otros sustratos como trombina, plasmina o proteína C activada aunque de forma mucho mas débil.

En humanos PAI-1 se encuentra fundamentalmente circulante en plasma, en las plaquetas y en las células endoteliales aunque puede ser producido por una gran variedad de células y tejidos. Su expresión genética (cromosoma 7 q21.3-a22) puede ser inducida por diferentes estímulos fisiológicos como angiotensina II, o $\text{tnf-}\alpha$

Los efectos de PAI-1 son conocidos sobretodo a nivel intravascular aunque recientemente se ha demostrado que también interviene en los procesos de crecimiento tumoral y metástasis o inhibiendo la apoptosis celular. A nivel intravascular hace años que se estudian sus efectos. La sangre humana contiene básicamente dos fuentes de PAI-1: la que se encuentra circulante en plasma representa únicamente en torno al 10% del total (en condiciones fisiológicas) puesto que la mayor parte se encuentra dentro de las plaquetas que constituyen el mayor reservorio. De este modo la concentración plasmática de PAI-1 puede incrementarse hasta 10 veces cuando se produce una herida y las plaquetas activadas liberan su contenido al torrente circulatorio. Se consigue así frenar la fibrinólisis limitando la producción de plasmina, y es por esto que las alteraciones genéticas en la producción de PAI-1 se presentan en forma de hemorragias patológicas.

Existen numerosos estudios en la bibliografía que demuestran la relación entre capacidad fibrinolítica alterada, elevación de los niveles de PAI-1 y enfermedad cardiovascular (Vaughan, Rouleau et al. 1995; Juhan-Vague, Pyke et al. 1996). El seguimiento de más de 3000 pacientes con angina de pecho demostró una asociación entre eventos coronarios y niveles elevados de PAI-1. Posteriormente también se ha observado que la expresión de PAI-1 está incrementada en lesiones ateromatosas arteriales lo que podría facilitar eventos trombóticos tras la ruptura de la placa. Finalmente también es bien conocido el efecto negativo de PAI-1 sobre la eficacia del tratamiento trombolítico del infarto de miocardio reduciendo la recanalización e incrementando la tasa de reoclusión (Collet, Montalescot et al.

2003). Este hecho motivó la síntesis por ingeniería genética de nuevos activadores del plasminógeno resistentes a la acción de PAI-1. Así nació en Tenecteplasa o TNK, variante del t-PA que gracias a un pequeño cambio en la secuencia de aminoácidos presenta menor inactivación por PAI-1, mayor especificidad por la fibrina y mayor vida media (Davydov and Cheng 2001).

Pese a que los efectos de PAI-1 en la enfermedad coronaria son bien conocidos, existen pocos estudios acerca de su comportamiento en la fase aguda del infarto cerebral y se desconoce su influencia en el tratamiento fibrinolítico del ictus.

Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina. TAFI

TAFI es una metalocarboxipeptidasa de 60 kDa presente en el plasma, cuya síntesis es predominantemente hepática (Bajzar, Manuel et al. 1995). Fue simultánea e independientemente descubierta por varios grupos, por lo que la molécula se conoce por diferentes nombres: procarboxipeptidasa B, R o U aunque parece imponerse finalmente el término TAFI. Se expresa como un precursor latente que requiere un clivaje proteolítico antes de alcanzar su actividad biológica. Esta activación se puede producir por plasmina tripsina o trombina, pero es esta última la más potente e interesante puesto que liga los fenómenos de la coagulación y la fibrinólisis. La activación trombina-dependiente de TAFI se incrementa del orden de 1000 veces en presencia de trombomodulina. La generación de trombina durante la fase de propagación de la coagulación es suficiente para la activación de TAFI que facilita la formación y el crecimiento del trombo. Tras su activación, TAFI destruye los residuos carboxiterminales de lisina de la fibrina parcialmente degradada. Al eliminar estos residuos se frena drásticamente la fibrinólisis puesto que estos residuos constituyen los puntos de anclaje e interacción de tPA y plasminógeno. Se trata de un paso crucial en la activación de plasmina que de esta forma queda bloqueado impidiéndose la degradación de las cadenas de fibrina.

Existen datos equivocados acerca del papel de TAFI como factor de riesgo vascular. Mientras algunos trabajos muestran que niveles elevados de TAFI funcional incrementan el riesgo de padecer enfermedad

coronaria o ictus (Santamaria, Oliver et al. 2003; Santamaria, Martinez-Rubio et al. 2004), otros han relacionado niveles plasmáticos elevados de TAFI con menor riesgo de sufrir eventos coronarios (Juhan-Vague and Morange 2003). Esta aparente contradicción conocida como la paradoja de TAFI, es explicada por algunos por la teoría de consumo: en los casos en los que existe una alta afinidad entre fibrina y TAFI, y por tanto elevada actividad anti-fibrinolítica, la mayor parte de las moléculas de TAFI se encontrarían "secuestradas" por el trombo y por tanto los niveles plasmáticos de TAFI circulante serían bajos. Aunque resulte una explicación atractiva esta teoría no está demostrada. Otros explican la discrepancia en los estudios por el hecho de que en unos se determina la actividad de TAFI mientras en otros se determinan conjuntamente las fracciones activas y las inactivas.

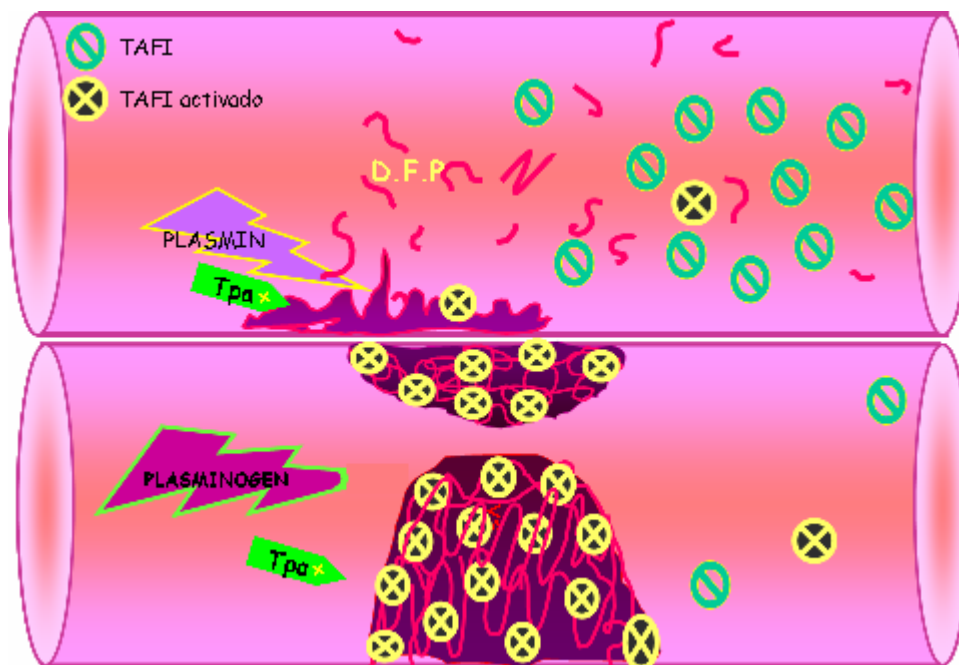


Figura 5: Teoría del consumo de TAFI.

En este caso TAFI presenta poca afinidad por fibrina, los niveles de TAFI circulante son elevados y la actividad fibrinolítica esta elevada.

Si TAFI presenta una gran afinidad por fibrina, existe un consumo de TAFI circulante, y la fibinólisis está inhibida

Lipoproteína(a). Lp(a)

La identificación de Lp(a) en plasma como partícula de la familia de las LDL data de 1963. En efecto la composición de Lp(a) es muy similar a la de LDL en lo que respecta a colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y apo B100. El descubrimiento de apo(a), componente único y distintivo de Lp(a), y perteneciente a la familia de los genes de plasminógeno, no se realizó hasta 25 años más tarde. La estructura conformacional de la glicoproteína apo(a) muestra un gran parecido con la de plasminógeno, precursor de plasmina. Este descubrimiento le confiere a Lp(a) una enorme importancia puesto que se trata de una molécula que combinaría los procesos de aterosclerosis y trombosis (Angles-Cano, de la Pena Diaz et al. 2001). Desde entonces numerosos estudios han demostrado que Lp(a) es un factor de riesgo independiente para enfermedad vascular y que juega un papel clave en el desarrollo prematuro de aterosclerosis y de enfermedad coronaria o cerebrovascular (Ariyo, Thach et al. 2003). Los mecanismos por los cuales Lp(a) induce los procesos aterogénicos o trombóticos no son todavía bien conocidos. Los residuos Lys de las cadenas de fibrina actúan como receptores específicos donde viene a unirse plasminógeno antes de convertirse en plasmina (t-PA mediante) y así ejercer su acción fibrinolítica. El descubrimiento de depósitos de Lp(a) asociados a fibrina en placas ateroscleróticas indicarían que Lp(a) (apo(a) en concreto), actuaría como un inhibidor competitivo de plasminógeno impidiendo la formación de fibrina y por lo tanto inhibiendo la fibrinólisis. Estudios recientes indican que Lp(a) también es capaz de inhibir la fibrinólisis estimulando la expresión de PAI-1 e inhibiendo la de t-PA en las células endoteliales. Todas estas características confieren a Lp(a) un potente efecto antifibrinolítico cuyo impacto en la fase aguda del ictus y en su tratamiento con t-PA es desconocido.

Homocisteína. Hcy.

La homocisteína es un aminoácido sulfurado originado a partir de la demetilación de la metionina. Entre un 5 y 7% de la población presenta niveles moderadamente elevados de homocisteína plasmática. Defectos genéticos y deficiencias en el aporte de vitaminas y folatos pueden causar alteraciones

enzimáticas responsables de hiperhomocisteinemia. En 1969, los estudios de McCully en niños afectados de homocistinuria mostraron que la hiperhomocisteinemia a través de mecanismos oxidativos produce daño y disfunción endotelial aumentando la propensión aterogénica y trombogénica (McCully 1969). Además de dañar al endotelio, homocisteína interviene sobre el sistema de la coagulación/fibrinólisis: ejerce un papel protrombótico interfiriendo negativamente sobre la fibrinólisis al disminuir la actividad de t-PA e incrementar la de PAI-1 (Hajjar 1993). Finalmente posee un efecto proinflamatorio estimulando la quimiotaxis de los monocitos al aumentar la producción de la quimiocina MCP-1 por la célula endotelial (monocyte chemoattractant protein-1) (Sung, Slow et al. 2001).

En la última década un gran número de estudios ha demostrado que la presencia de niveles moderadamente elevados de homocisteína constituye un factor de riesgo independiente para aterosclerosis coronaria y periférica (Malinow, Kang et al. 1989; Kang, Wong et al. 1992). El papel de hiperhomocisteinemia como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular, durante años discutido, está ampliamente aceptado hoy en día (Alvarez Sabin, Turon et al. 1999; Eikelboom, Hankey et al. 2000). Existen estudios que muestran que la concentración plasmática de homocisteína aumenta gradualmente desde el día 1 hasta el 14 tras el ictus (Howard, Sides et al. 2002), pero no existen datos acerca de los niveles de homocisteína en la fase hiperaguda del ictus y su posible influencia sobre la evolución clínica tras el tratamiento fibrinolítico.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis son:

- 1. Estudiar las concentraciones plasmáticas de diferentes inhibidores endógenos de la fibrinólisis (PAI-1, TAFI, Lp(a) y Hcy) en la fase hiperaguda del ictus isquémico.**
- 2. Determinar el papel que juegan PAI-1, TAFI, Lp(a) y Hcy sobre los resultados del tratamiento trombolítico con t-PA: la recanalización arterial y evolución clínica posterior**
- 3. Determinar la influencia de PAI-1, TAFI, Lp(a) y Hcy sobre la más temida de las complicaciones del tratamiento trombolítico del ictus, la transformación hemorrágica sintomática**

3. MÉTODOS

1. Selección de pacientes

Estudiamos prospectivamente todos los pacientes que acudieron a nuestro servicio de urgencias con un ictus no lacunar desde diciembre de 2002 hasta febrero de 2003. Se realizó un Doppler transcraneal y carotídeo urgente a cuatrocientos treinta pacientes de los cuales setenta y uno presentaron una oclusión aguda de la arteria cerebral media y cumplían criterios para ser tratados con t-PA (0.9 mg/kg) (1995; NINDS). En el primero de los trabajos, en el que estudiamos la influencia de los inhibidores de la fibrinólisis sobre la recanalización, seleccionamos únicamente aquellos que presentaban una oclusión proximal de la arteria cerebral media (n=44) con el fin de homogeneizar la muestra y evitar posibles errores de interpretación del Doppler transcraneal en las oclusiones distales de la arteria cerebral media. Para el segundo trabajo, en el que se estudio el impacto de las citadas moléculas sobre la transformación hemorrágica seleccionamos a todos los pacientes independientemente de la localización de la oclusión arterial.

2. Variables clínicas.

Realizamos una historia clínica detallada incluyendo los factores de riesgo vascular de todos los pacientes. Con el fin de identificar la causa del ictus se realizó una batería de exploraciones complementarias incluyendo en los casos indicados estudio de trombofilia, ecocardiografía transtorácica o transesofágica y monitorización con Holter. Con esta información y los datos de neuroimagen se clasificaron los ictus en las categorías etiológicas TOAST (Adams, Bendixen et al. 1993): cardioembólico, aterotrombótico, otras causas o indeterminado.

Se realizaron exploraciones clínicas seriadas durante las primeras horas y al alta, y se determinó la afectación neurológica mediante la escala NIHSS (Brott, Haley et al. 1992). Definimos como mejoría o empeoramiento variaciones superiores a 4 puntos en dicha escala y recuperación espectacular como mejoría de más de 10 puntos o NIHSS inferior a 1 a las 12 horas del inicio de los síntomas. La

discapacidad funcional se evaluó al tercer mes mediante la escala de Rankin modificada considerando al paciente independiente si su puntuación era inferior o igual a 2 (1988, The Dutch TIA trial).

3. Protocolo de Doppler transcraneal

Se realizó un estudio completo de Doppler transcraneal en todos los pacientes a su llegada a urgencias, previo a la administración de t-PA. Mediante la escala TIBI se identificó la presencia de la oclusión arterial (Demchuk, Christou et al. 2000). Definimos un punto de corte en 45 mm. de profundidad desde la ventana temporal para categorizar la localización de la oclusión arterial en proximal o distal .

Mediante un casco fijador de la sonda de ultrasonidos se monitorizó de forma continua el flujo de la arteria cerebral media afectada durante las dos horas posteriores a la administración de t-PA con el fin de identificar el momento y grado de recanalización de forma inmediata.

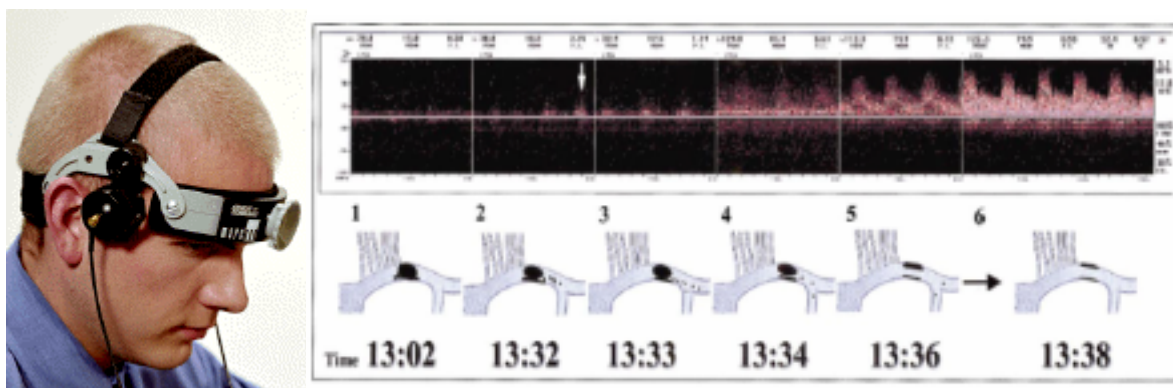


Figura 4: la fijación de la sonda mediante un casco especial permite monitorizar de forma continua la ACM durante la infusión de t-PA y diagnosticar el momento exacto de la recanalización.

4. Neuroimagen: Tomografía Computarizada y Resonancia Magnética cerebral

Inmediatamente después del Doppler transcraneal se realizó una prueba de neuroimagen (tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética) a todos los pacientes, antes de iniciarse el tratamiento con t-PA. En todos los casos se repitió la TC craneal entre las 24 y 36 horas para evaluar la presencia de una transformación hemorrágica. Además, siempre que se observó un empeoramiento neurológico

(incremento de más de 4 puntos en la escala NIHSS) se realizó inmediatamente una TC craneal para descartar transformación hemorrágica sintomática.

Las transformaciones hemorrágicas se clasificaron siguiendo los criterios del estudio ECASS (Hacke, Kaste et al. 1995) en infarto hemorrágico tipo 1 o 2 y hematoma parenquimatoso tipo 1 o 2 (figura 4). Definimos las transformaciones hemorrágicas como sintomáticas, la presencia de cualquier sangrado en la TC de control acompañada de empeoramiento neurológico (incremento > 4 puntos en la escala NIHSS).

5. Suero: Obtención de muestras, conservación y análisis.

Instantes antes de la administración de t-PA se recogieron muestras de sangre venosa periférica de todos los pacientes en tubos con EDTA y citrato. Se procedió inmediatamente a su centrifugado a 3000 rpm a 4°C durante 15 minutos; las muestras de plasma y suero fueron alicuotadas y congeladas a -80°C hasta su análisis. Los niveles de homocisteína se determinaron mediante enzimo-inmunoensayo de polarización de fluorescencia. La concentración de PAI-1, TAFI y Lp(a) se midió mediante kits de ELISA comercializados. Todos los análisis se realizaron por duplicado siendo los coeficientes de variación inter-ensayo inferiores al 10% para todas las moléculas.

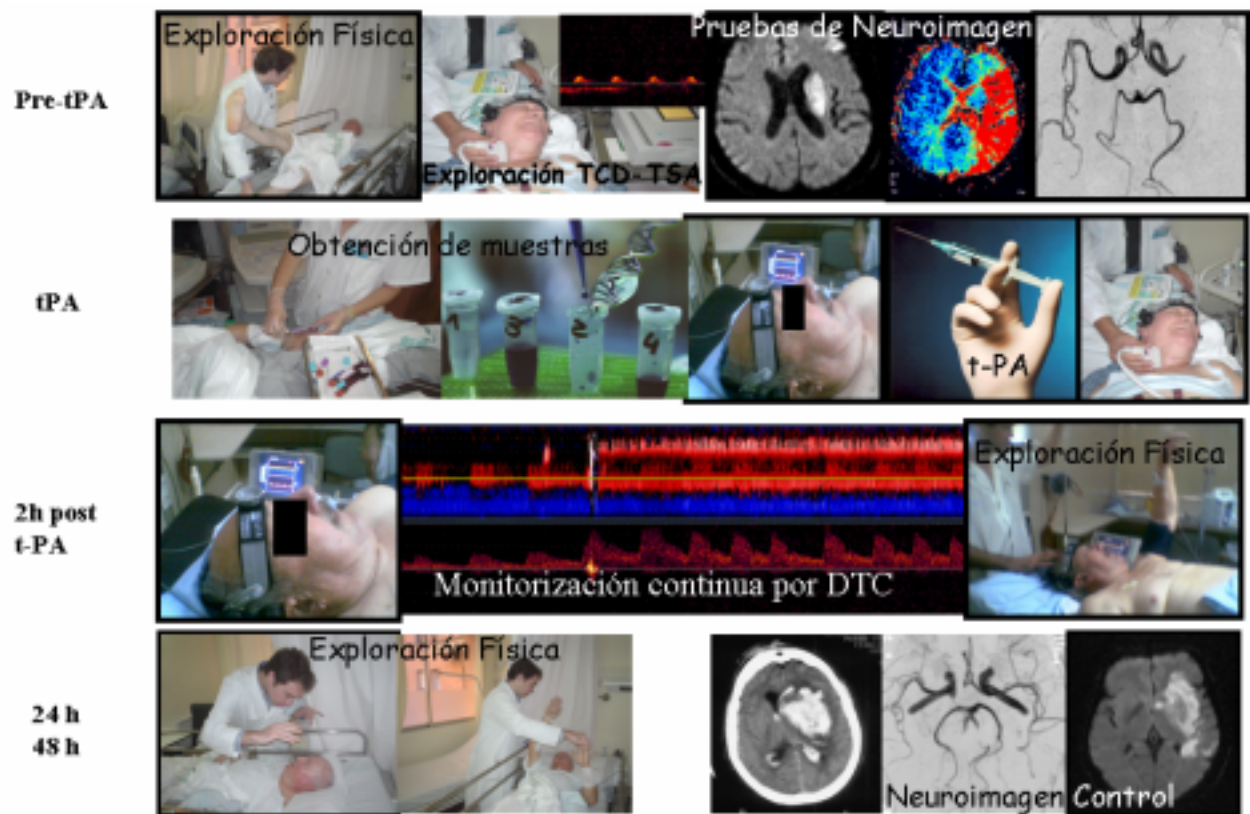


Figura 7: Esquema del protocolo seguido para los estudios.

4. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

5. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Concentración plasmática de los inhibidores de la fibrinólisis en la fase hiperaguda del ictus isquémico.

La determinación de las concentraciones de las distintas moléculas inhibidoras endógenas de la fibrinólisis dentro de las primeras tres horas tras el inicio de los síntomas mostró que no existía correlación alguna entre ellas. Esto indica que cada una de ellas varía independientemente de las demás en este intervalo de tiempo. Tampoco se encontraron diferencias respecto a las categorías TOAST, indicando que en la fase hiperaguda el mecanismo etiológico responsable no influye sobre estos marcadores.

PAI-1

Los niveles plasmáticos de PAI-1 (media 33.1 ± 12.2 ng/dl) se situaron dentro de los rangos de normalidad de nuestro laboratorio (32.9 ± 10.07 ng/dl). Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de PAI-1 con respecto a la edad, sexo, tiempo desde el inicio de los síntomas o historia de factores de riesgo vascular.

Lp(a)

Las determinaciones de Lp(a) fueron ligeramente superiores a las de nuestra población control sana (mediana 10 mg/dl Vs 5.8 mg/dl; $p=0.073$). Lp(a) se correlacionó también con la edad, pero no con la gravedad inicial de los síntomas ni con la etiología.

TAFI

Los niveles de TAFI de nuestros pacientes se situaron sensiblemente por encima de los valores de normalidad de referencia ($167.2 \pm 57.8\%$ Vs $109.4 \pm 29.4\%$ $p < 0.001$). No se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de TAFI respecto a la edad, sexo, historia de factores de riesgo, o causa etiológica. (Anexo 1)

Homocisteína

Los niveles basales de homocisteína detectados fueron ligeramente superiores a los de la población control sana (mediana 12 Vs 8.9) y se correlacionaron positivamente con la edad de los pacientes y negativamente con el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. (Anexo 2)

Implicaciones.

Los resultados obtenidos muestran que existen notables diferencias en los niveles plasmáticos de los inhibidores de la fibrinólisis con respecto a controles sanos (figura 8). Más importante si cabe es el hecho de que se observaron una gran variabilidad inter-individual en las concentraciones de las citadas moléculas entre los pacientes (figura 9); esto sugiere que el potencial fibrinolítico global en las primeras horas tras el ictus varía mucho entre sujetos pudiendo ser uno de los determinantes de las diferentes respuestas tras el tratamiento con t-PA en lo que respecta a recanalización arterial y transformación hemorrágica.

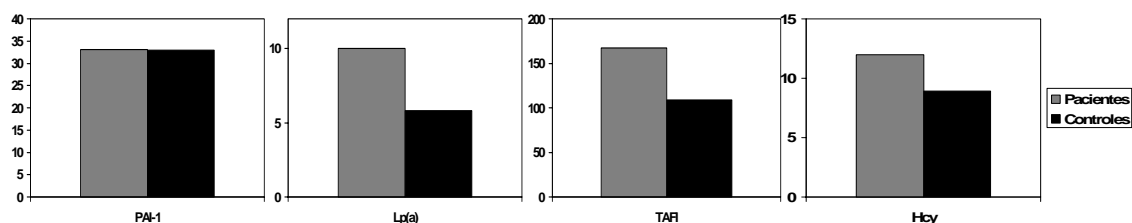


Figura 8: Niveles plasmáticos de los distintos inhibidores de la fibrinólisis estudiados en los pacientes con un ictus de menos de tres horas de evolución y en controles sanos.

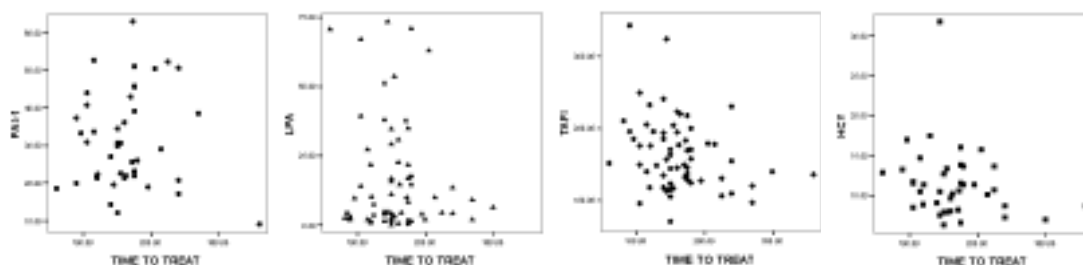
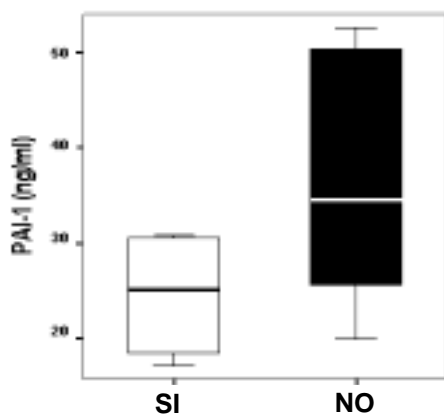
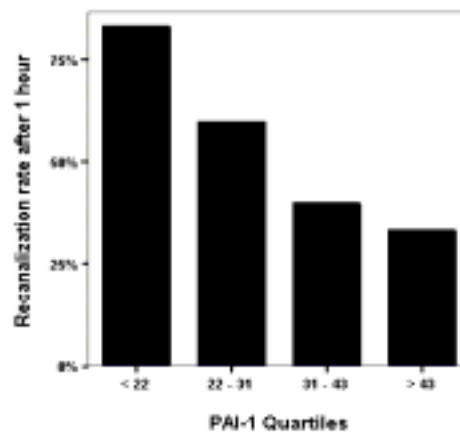
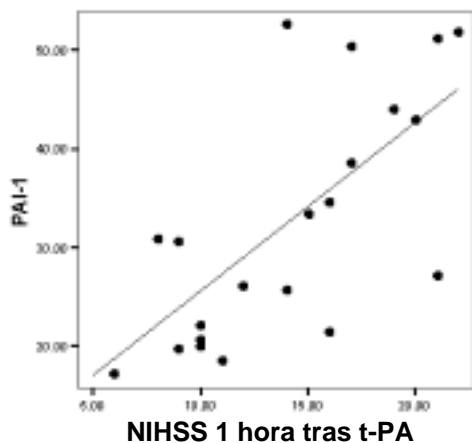


Figura 9: Esta figura muestra que no existe correlación entre el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y los niveles medidos de las distintas moléculas aunque permite apreciar la importante variabilidad inter-individual en las concentraciones plasmáticas.

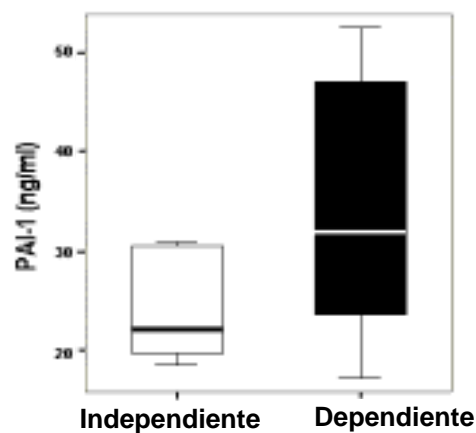
2. Influencia sobre la recanalización de la arteria cerebral media.

PAI-1

Los pacientes que respondieron al tratamiento con t-PA con recanalización de la ACM dentro de la primera hora post-tratamiento presentaron niveles basales de PAI-1 significativamente inferiores a los que no recanalizaron (27.8 ng/ml Vs 38.8 ng/ml; $p=0.047$). Esta propensión a la recanalización tuvo además su traducción clínica: los niveles plasmáticos de PAI-1 se correlacionaron con la puntuación en la escala NIHSS a la hora ($r=0.67$; $p=0.001$) y los pacientes que presentaron una mejoría espectacular presentaron niveles basales de PAI-1 inferiores. Finalmente, los pacientes funcionalmente independientes al tercer mes también presentaron niveles más bajos de PAI-1 pre-tratamiento.



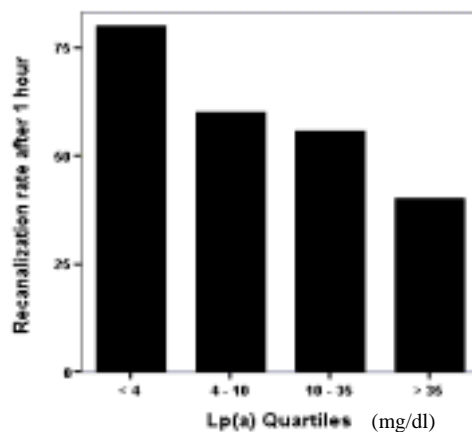
Recuperación espectacular a las 12 h.



Pronóstico funcional al tercer mes

Lp(a)

Observamos una tendencia a presentar niveles basales de Lp(a) más bajos entre aquellos pacientes que recanalizaron precozmente, aunque sin alcanzar significación estadística (15.5 mg/dl Vs 30 mg/dl; $p=0.077$), a diferencia que con PAI-1 esta tendencia no se reflejó en la evolución clínica.



TAFI y Homocisteína

En nuestro grupo de pacientes no observamos relación alguna entre los niveles basales de TAFI o Hcy y la respuesta al tratamiento con t-PA, tanto en lo que se refiere a la recanalización arterial como a la mejoría clínica

Predictores de recanalización.

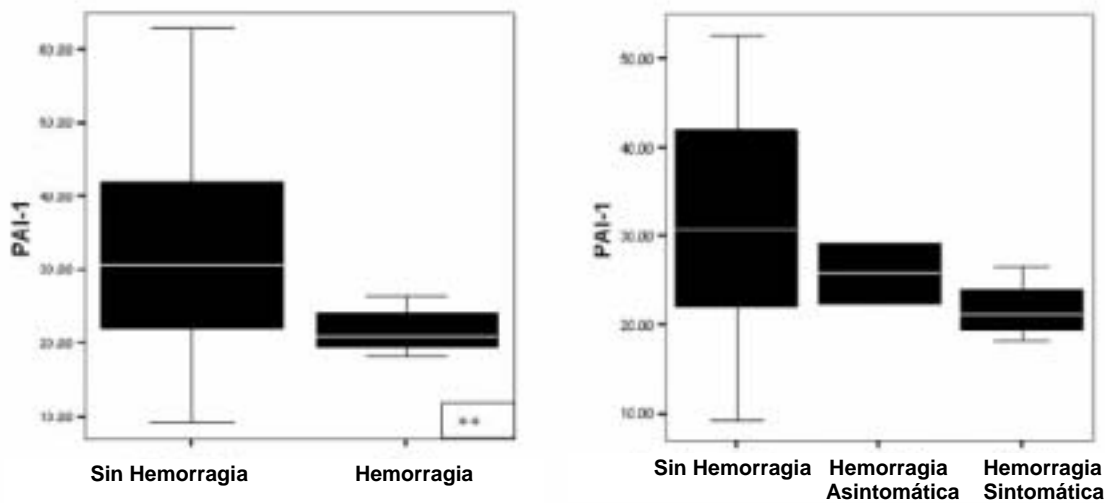
De entre todas las variables estudiadas únicamente se relacionaron con resistencia a la recanalización arterial: antecedente de dislipemia, niveles basales de PAI-1 y de Lp(a). Tras aplicar un modelo de regresión logística observamos que el único predictor independiente de resistencia a la recanalización fue la determinación de niveles plasmáticos basales de PAI-1 superiores a 34 ng/ml.

3. Influencia sobre la transformación hemorrágica

PAI-1

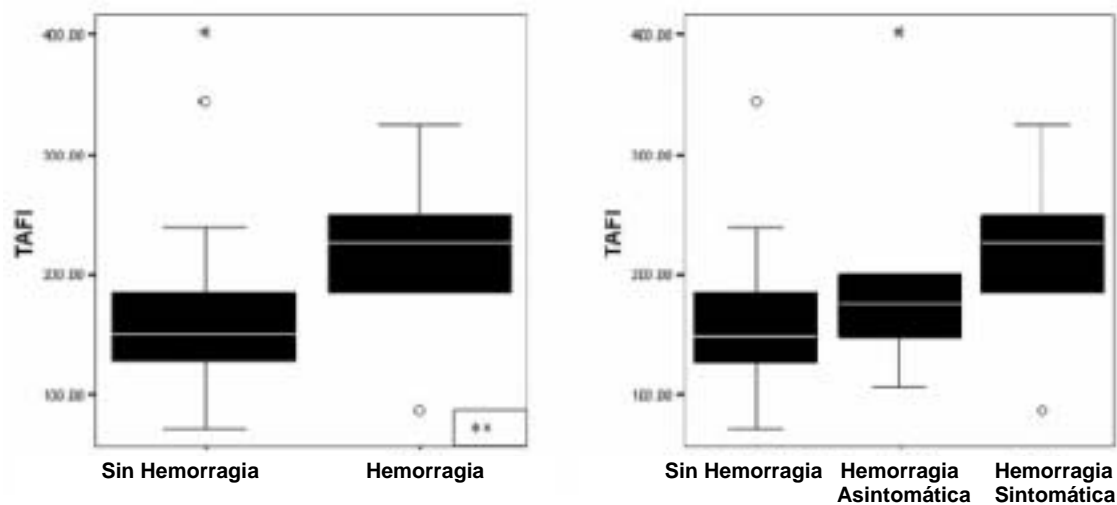
Los pacientes que sufrieron una transformación hemorrágica sintomática presentaron niveles mas bajos de PAI-1 que el resto (21,7 Vs 31,8; $p < 0,001$).

Observamos una gradación en los niveles basales de PAI-1 con respecto a la gravedad de la transformación hemorrágica. Los niveles más bajos de PAI-1 correspondieron a aquellos pacientes que padecieron una transformación hemorrágica sintomática, seguidos de los que sufrieron una hemorragia asintomática, finalmente en los que no se identifico ningún sangrado se determinaron los niveles más altos de PAI-1.



TAFI

Los pacientes que padecieron una transformación hemorrágica sintomática presentaron niveles plasmáticos de TAFI más elevados (217% Vs 162%; $p=0.027$), de nuevo observamos una gradación dependiendo de la gravedad de la hemorragia.



Lp(a) y Homocisteína

Los niveles basales de Lp(a) y de homocisteína no se relacionaron con la aparición posterior de transformación hemorrágica.

Predictores de transformación hemorrágica sintomática.

De entre todas las variables estudiadas las únicas que se asociaron con transformación hemorrágica sintomática fueron los niveles basales de PAI-1 y TAFI. El modelo de regresión logística mostró como único predictor independiente de transformación hemorrágica sintomática concentraciones de PAI-1 inferiores a 21,4 ng/ml.

Implicaciones.

En las primeras horas tras el ictus los inhibidores endógenos de la fibrinólisis influyen sobre la respuesta al tratamiento fibrinolítico en lo que respecta a la recanalización arterial, la transformación hemorrágica y la evolución clínica.

Cuantificar algunas de estas moléculas o el potencial fibrinolítico global de forma rápida, antes de la administración del t-PA, permitiría predecir una resistencia a la recanalización precoz de los vasos cerebrales o cuantificar el riesgo de padecer una transformación hemorrágica. Así podríamos adelantarnos a los acontecimientos y adoptar medidas terapéuticas más o menos agresivas como individualizar las dosis de t-PA, la combinación de fármacos o plantearnos el tratamiento intra-arterial.

6. CONCLUSIONES

- 1. En las tres primeras horas tras el establecimiento del ictus se observan grandes diferencias inter-individuales en los niveles plasmáticos de los inhibidores de la fibrinólisis PAI-1, TAFI, Lp(a) y Hcy. Estos tres últimos además están sensiblemente más elevados que en una población sana control.**

- 2. Los inhibidores de la fibrinólisis y en especial PAI-1 influyen sobre la respuesta al tratamiento fibrinolítico del ictus con t-PA. Niveles bajos de PAI-1 predicen la recanalización arterial precoz y se asocian con mejor evolución clínica.**

- 3. Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 y TAFI antes de la administración de t-PA en los pacientes con un ictus isquémico predicen el desarrollo posterior de una transformación hemorrágica sintomática.**

7. ANEXO

8. Bibliografía

- (1988). "The Dutch TIA trial: protective effects of low-dose aspirin and atenolol in patients with transient ischemic attacks or nondisabling stroke. The Dutch TIA Study Group." Stroke 19(4): 512-7.
- (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." N Engl J Med 333(24): 1581-7.
- (1997). "Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group." Stroke 28(11): 2109-18.
- Adams, H. P., Jr., B. H. Bendixen, et al. (1993). "Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment." Stroke 24(1): 35-41.
- Adams, H. P., Jr., T. G. Brott, et al. (1996). "Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association." Circulation 94(5): 1167-74.
- Alexandrov, A. M., CA. Grotta, JC. Ford, SR. Garami, Z. Montaner, J. Alvarez-Sabin, J. Saqqur, M. Demchuk, AM. Chernyshev OY. Moye, LA. Hill, MD. Wojner, AW. for the CLOTBUST Investigators (2004 (in press)). "A Multi-center Randomized Trial of Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke." N Engl J Med.
- Alexandrov, A. V., S. E. Black, et al. (1997). "Predictors of hemorrhagic transformation occurring spontaneously and on anticoagulants in patients with acute ischemic stroke." Stroke 28(6): 1198-202.
- Alexandrov, A. V., W. S. Burgin, et al. (2001). "Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement." Circulation 103(24): 2897-902.
- Alexandrov, A. V., A. M. Demchuk, et al. (2002). "Insonation method and diagnostic flow signatures for transcranial power motion (M-mode) Doppler." J Neuroimaging 12(3): 236-44.
- Alexandrov, A. V., A. M. Demchuk, et al. (2000). "Intracranial clot dissolution is associated with embolic signals on transcranial Doppler." J Neuroimaging 10(1): 27-32.
- Alvarez Sabin, J., J. Turon, et al. (1999). "[Plasma homocysteine levels in patients with transient ischemic attacks]." Med Clin (Barc) 113(14): 531-2.
- Angles-Cano, E., A. de la Pena Diaz, et al. (2001). "Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein(a)." Ann N Y Acad Sci 936: 261-75.
- Ariyo, A. A., C. Thach, et al. (2003). "Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly." N Engl J Med 349(22): 2108-15.
- Bajzar, L., R. Manuel, et al. (1995). "Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor." J Biol Chem 270(24): 14477-84.
- Blinic, A., C. W. Francis, et al. (1993). "Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro." Blood 81(10): 2636-43.
- Brott, T. G., E. C. Haley, Jr., et al. (1992). "Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes." Stroke 23(5): 632-40.

- Cintas, P., F. Nguyen, et al. (2004). "Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles." J Thromb Haemost 2(7): 1163-6.
- Collet, J. P., G. Montalescot, et al. (2003). "Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality." Circulation 108(4): 391-4.
- Christou, I., A. V. Alexandrov, et al. (2000). "Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke." Stroke 31(8): 1812-6.
- Christou, I., R. A. Felberg, et al. (2002). "Intravenous tissue plasminogen activator and flow improvement in acute ischemic stroke patients with internal carotid artery occlusion." J Neuroimaging 12(2): 119-23.
- Davydov, L. and J. W. Cheng (2001). "Tenecteplase: a review." Clin Ther 23(7): 982-97; discussion 981.
- Demchuk, A. M., W. S. Burgin, et al. (2001). "Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." Stroke 32(1): 89-93.
- Demchuk, A. M., I. Christou, et al. (2000). "Specific transcranial Doppler flow findings related to the presence and site of arterial occlusion." Stroke 31(1): 140-6.
- Eikelboom, J. W., G. J. Hankey, et al. (2000). "Association between high homocyst(e)ine and ischemic stroke due to large- and small-artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke." Stroke 31(5): 1069-75.
- Gils, A. and P. J. Declercq (2004). "Plasminogen activator inhibitor-1." Curr Med Chem 11(17): 2323-34.
- Gils, A. and P. J. Declercq (2004). "The structural basis for the pathophysiological relevance of PAI-I in cardiovascular diseases and the development of potential PAI-I inhibitors." Thromb Haemost 91(3): 425-37.
- Hacke, W., M. Kaste, et al. (1995). "Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)." Jama 274(13): 1017-25.
- Hajjar, K. A. (1993). "Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor." J Clin Invest 91(6): 2873-9.
- Heuschmann, P. U., K. Berger, et al. (2003). "Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group." Stroke 34(5): 1106-13.
- Howard, V. J., E. G. Sides, et al. (2002). "Changes in plasma homocyst(e)ine in the acute phase after stroke." Stroke 33(2): 473-8.
- Juhan-Vague, I. and P. E. Morange (2003). "Very high TAFI antigen levels are associated with a lower risk of hard coronary events: the PRIME Study." J Thromb Haemost 1(10): 2243-4.
- Juhan-Vague, I., S. D. Pyke, et al. (1996). "Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities." Circulation 94(9): 2057-63.
- Kang, S. S., P. W. Wong, et al. (1992). "Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease." Annu Rev Nutr 12: 279-98.
- Kaps, M., M. S. Damian, et al. (1990). "Transcranial Doppler ultrasound findings in middle cerebral artery occlusion." Stroke 21(4): 532-7.

- Larrue, V., R. von Kummer, et al. (1997). "Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study." Stroke 28(5): 957-60.
- Lauer, C. G., R. Burge, et al. (1992). "Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis." Circulation 86(4): 1257-64.
- Ley-Pozo, J. and E. B. Ringelstein (1990). "Noninvasive detection of occlusive disease of the carotid siphon and middle cerebral artery." Ann Neurol 28(5): 640-7.
- Malinow, M. R., S. S. Kang, et al. (1989). "Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease." Circulation 79(6): 1180-8.
- McCully, K. S. (1969). "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis." Am J Pathol 56(1): 111-28.
- Molina, C., M. Ribo, et al. (2005). "Microbubbles Administration Accelerates Clot Lysis During Continuous 2 MHz Ultrasound Monitoring In Stroke Patients Treated With Intravenous tPA." International Stroke Conference 2005 (abstract).
- Molina, C. A., J. Alvarez-Sabin, et al. (2002). "Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion." Stroke 33(6): 1551-6.
- Molina, C. A., J. Montaner, et al. (2001). "Time course of tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute cardioembolic stroke: a case-control study." Stroke 32(12): 2821-7.
- Molina, C. A., J. Montaner, et al. (2001). "Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke." Stroke 32(5): 1079-84.
- Molina, C. A., J. Montaner, et al. (2004). "Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes." Stroke 35(2): 486-90.
- Montaner, J., C. A. Molina, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke." Circulation 107(4): 598-603.
- Montaner, J., M. Ribo, et al. (2003). "Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke." Stroke 34(4): 1038-40.
- Ribo, M., Z. Garami, et al. (2004). "Detection of reversed basilar flow with power-motion Doppler after acute occlusion predicts favorable outcome." Stroke 35(1): 79-82.
- Ribo, M., J. Montaner, et al. (2004). "[Role of homocysteine in the acute phase of stroke]." Neurologia 19(1): 10-4.
- Santamaria, A., A. Martinez-Rubio, et al. (2004). "Risk of acute coronary artery disease associated with functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor plasma level." Haematologica 89(7): 880-1.
- Santamaria, A., A. Oliver, et al. (2003). "Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels." Stroke 34(10): 2387-91.
- Sung, F. L., Y. L. Slow, et al. (2001). "Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis." Mol Cell Biochem 216(1-2): 121-8.
- Tachibana, K. (1992). "Enhancement of fibrinolysis with ultrasound energy." J Vasc Interv Radiol 3(2): 299-303.

- Vaughan, D. E., J. L. Rouleau, et al. (1995). "Role of the fibrinolytic system in preventing myocardial infarction." Eur Heart J 16 Suppl K: 31-6.
- Zanette, E. M., C. Fieschi, et al. (1989). "Comparison of cerebral angiography and transcranial Doppler sonography in acute stroke." Stroke 20(7): 899-903.
- Zunker, P., A. Schick, et al. (1999). "Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in patients with acute ischemic stroke: relation to stroke etiology." Neurol Res 21(8): 727-32.