

ORIGINALES

Importancia del Fibrinógeno como factor de riesgo en aterosclerosis avanzada de los miembros inferiores

Value of Fibrinogen as a risk factor in severe atherosclerotic legs

J. Segura Ollé - C. Berga Fauría - A. Espinosa Plaza - J. Díaz Torrens - V. Martín Paredero

Servicio de Angiología y Cirugía Vascular
(Dr. V. Martín Paredero)
Hospital Universitari «Joan XXIII»
Tarragona (España)

RESUMEN

Objetivo: Valoración del fibrinógeno y su modulación, tanto a nivel plasmático como en la pared arterial, en fases avanzadas de aterosclerosis en miembros inferiores.

Método: Análisis de muestras de sangre y de pared arterial en un grupo de 16 pacientes con arteriosclerosis de miembros inferiores que fueron intervenidos quirúrgicamente sobre el sector femoropoplíteo. Comparación de los parámetros sanguíneos con un grupo de sujetos sanos y niveles aceptados como normales. Valoración de: Fibrinógeno plasmático, marcador de fibrinólisis (Dímero-D), Interleukina-6 e inhibidor de plasminógeno (PAI-1), comparación de hematocrito y n.º de leucocitos. A nivel de la pared arterial se ha valorado el grado de actividad medido por la producción de factores fibrinolíticos (tPA y UK) en distintas fases de tiempo, tras incubación de la misma en un medio buffer apropiado. También se ha valorado el halo de lisis de un fragmento de pared tras incubación en placa de Petri con fibrina rica en plasminógeno durante más de 20 horas.

Resultados: A nivel plasmático observamos unos niveles significativamente elevados de: Fibrinógeno, Dímero-D, e Interleukina-6 y niveles moderadamente elevados de PAI-1 al compararlos con grupo control y/o niveles normales. No se halló diferencia entre niveles de hematocrito y n.º de leucocitos. Se apreció correlación lineal significativa entre niveles de D-Dímero y PAI-1 ($r=0,543$ $p=0,029$).

A nivel de la pared arterial pudimos apreciar una pobre actividad fibrinolítica, tanto por los niveles de producción de

factores (tPA y UK) como por el área de lisis de fragmentos de pared arterial.

Conclusión: Pensamos que el fibrinógeno puede jugar un papel como factor de riesgo también en las fases avanzadas de aterosclerosis. Su modulación parece tener más importancia en la fase plasmática que a nivel de la pared arterial «enferma».

Palabras clave: Fibrinógeno; aterosclerosis femoral; enfermedad aterosclerótica.

SUMMARY

Purpose: Assessment of the fibrinogen significance and its modulation, both at plasmatic levels into the arterial wall, in advanced phases of lower limbs atherosclerosis.

Methods: Analysis of Blood samples and arterial wall fragments in a group of 16 patients with lower limbs arteriosclerosis who underwent femoralis-poplitea surgery. Comparison of blood parameters with a group of healthy people and levels accepted as normal. Assessment of: plasmatic Fibrinogen, fibrinolysis marker (D-Dimer), Interleukine-6 and plasminogen inhibitor (PAI-1), comparison of hematocrit and leukocyte number. At arterial wall levels, activity rate has been evaluated, measured by the fibrinolytic factors production (tPA and UK) at different time frames, after being incubated into a proper buffer solution. Further evaluation of the lytic arcus of a wall portion after its incubation into a Petri's plaque with plasminogen-rich fibrin for more than 20 hours.

Results: At plasmatic levels, we detected significantly high levels of: Fibrinogen, D-Dimer and Interleukine-6, and also moderately high levels of PAI-I compared to the control group and/or normal levels. There were no differences between he-

matocrit and leukocyte number levels. A significant linear correlation between D-Dimer and PAI-1 ($r=0.543$ $p=0.029$) was observed.

At arterial wall levels, we observed a poor fibrinolytic activity, both for factor production levels (tPA and UK) and for the lytic area of the arterial wall portions.

Conclusion: *The think that fibrinogen is a key risk factor also advanced phases of atherosclerosis. Its modulation seems to be more significant in the plasmatic phase than at «ill» arterial wall levels.*

Key words: Fibrinogen; atherosclerosis *femoralis*; atherosclerotic disease.

Introducción

Aunque durante las últimas cuatro décadas se han identificado y estudiado diversos factores de riesgo de padecer aterosclerosis: tabaquismo, hiperlipemia, hipertensión, etc. Existen otros factores, menos usados en la práctica clínica diaria, aunque igual de importantes, dentro de los causantes de arteriopatía.

Importantes estudios epidemiológicos han demostrado unos niveles altos de Fibrinógeno en pacientes con lesiones aterosclerosas en diferentes sectores del árbol arterial (1, 2, 3, 4), señalándolo incluso como factor causal independiente.

La participación del sistema Fibrinógeno-Fibrina y sus agentes moduladores tanto a nivel plasmático como en la pared arterial, ha sido estudiado en estudios experimentales en las fases iniciales de la lesión aterosclerótica (5, 6, 7). No obstante, en fases avanzadas de enfermedad arterial, todo este dinamismo atero-trombogénico sigue sin estar todavía muy clarificado.

Objetivo

Valoración del Fibrinógeno y su modulación, tanto a nivel plasmático como en la pared arterial, en fases avanzadas de aterosclerosis en miembros inferiores.

Material y método

Población: 16 pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores (grados III y IV), que fueron

sometidos a revascularización del sector femoropoplíteo entre abril de 1993 y noviembre de 1994.

17 sujetos sanos (grupo control) para comparación de parámetros sanguíneos.

Muestras:

- a) **Sangre:** 25cc. de sangre extraídos por paciente, tras 8 horas de ayuno y mediante punción de vena antebraquial, sin uso de compresor.
- b) **Pared arterial:** Extraídas durante la cirugía, filiadas y criopreservadas a -70 grados centígrados para posterior análisis histoquímico (CRYOSON BV-10).

Evaluación sanguínea:

1. Niveles de Fibrinógeno: mediante dos métodos
 - a) Funcional o cromométrico (Clauss) adaptado para JABLAB ST4 stego automatic analyzer (Kits Boehringer Mannheim).
 - b) Método inmunológico según técnica «sandwich» usando anticuerpos monoclonales contra el fibrinógeno (8).
2. Determinación cuantitativa ELISA de los productos de degradación del fibrinógeno en plasma (anticuerpos anti D-dímero).
3. Determinación cuantitativa ELISA de la interleukina-6.
4. Determinación cuantitativa ELISA del PAI-1 (anticuerpos anti-inhibidor del activador del plasminógeno 1).
5. Hemograma (haematology series system 900 automatic cell counter).

Estudio de la pared arterial:

- a) Valoración de la actividad fibrinolítica de la pared arterial mediante incubación de un fragmento de peso conocido, en un medio buffer a 37 grados y valoración de la producción de factores activadores de la fibrinólisis (tPA y UK) y de inhibidores de la fibrinólisis (PAI-1) a los diez minutos y a las 2 horas en cada muestra. Análisis inmunohistoquímico.

- b) Análisis de la superficie del halo de lisis que se produce tras incubación de fragmentos de pared de peso conocido y superficie superponible tras incubación, durante más de 20 horas, en placas de petri con lámina de fibrina rica en plasminógeno.
- c) Microscopía óptica mediante procesado de las muestras y posteriores tinciones de Herxheimer y hematoxilina-eosina-orceína. Para valorar estructura de las capas, depósitos e infiltración leucocitaria.

Análisis estadístico:

1. Análisis descriptivo: Para la descripción de las variables se ha utilizado media, mediana, desviación estándar y valores mínimo y máximo.
2. Análisis bivariante:
 - La comparación de la media se ha realizado mediante prueba *t* de Student.
 - Para valorar si la media de Dímero-D, PAI-1 y IL-6 son distintos de los valores de normalidad, se ha calculado su valor medio y el intervalo de confianza al 95 %.
 - La comparación de los valores hematológicos se ha efectuado mediante el cálculo de la *r* de Pearson y análisis de regresión lineal, con cálculo del intervalo de confianza de la recta de regresión.
 - Los valores de tPA, UK y PAI-1 a los 10 y a los 120 minutos se han comparado con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos repetidos.

El nivel de significación estadística ha sido $p < 0,05$.

Resultados

El número de Leucocitos y niveles de hematocrito que se obtuvo en los 16 pacientes afectados del sector femoro-poplíteo (grupo FP) fue superponible y sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los 17 casos control.

Los niveles de Fibrinógeno plasmático obtenidos con el método inmunológico fueron ligeramente más bajos que los determinados según el método cromométrico de Clauss, (380,5 $\pm$ 92,6 versus 440,6 $\pm$ 110,66 mg/dl), aunque no se apreció diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar la determinación del Fibrinógeno plasmático según método de Clauss entre el grupo control ($n=17$; 291,1 $\pm$ 58,7 mg/dl) y el grupo afecto de aterosclerosis femoropoplíteo ($n=16$; 440,5 $\pm$ 110,66 mg/dl), apreciamos valores significativamente más altos en los pacientes con aterosclerosis $p < 0,0001$.

Los niveles de Dímero-D del grupo FP son significativamente más elevados que los valores considerados como normales (<550 pg/ml) hallándose un 81,3 % de los 16 pacientes por encima de éstos. (Media=1055,3; Mediana=829; SD=622; Min=350; Max=2260 pg/ml). Intervalo de confianza 95 % (735-1375) no incluye 550, por tanto tiene significación estadística.

Los niveles de PAI-1 (inhibidor del plasminógeno) en plasma se hallaron en unos niveles moderadamente altos según los valores de referencia que marcaba el laboratorio (<110 ng/ml). Aunque en rango de normalidad (Media=35,8; Mediana=19,7; SD=28,8; Min=14; Max=109). IC 95 % sin significación estadística.

La determinación de IL-6 (interleukina-6), que refleja la actividad macrofágica, se encontró significativamente más elevada en los pacientes ateroscleróticos que los valores marcados como normales (<3 pg/ml). (Media=19,05; Mediana=23,7; SD=10,5; Min=2,5; Max=29,2). IC 95 % (13,5-24,6), dado que no incluye el nivel 3, es significativamente más elevado.

En el análisis de regresión lineal efectuado entre los distintos parámetros plasmáticos estudiados, únicamente se ha hallado significación estadística entre el Dímero-D y el PAI-1 ($R=0,543$ y $P=0,029$). No sucedió así entre PAI-1 y Fibrinógeno ($R=0,375$ y $P=0,15$), PAI-1 versus IL-6 ($R=0,16$ y $P=0,66$) e IL-6 versus Fibrinógeno ($R=0,39$ y $P=0,29$).

Pared arterial

En cuanto a la microscopía de la pared arterial, ésta mostró una deficiente capa endotelial con una marcada calcificación e infiltración lipídica en algunas partes de la pared, con una importante proliferación de las células musculares lisas y engrosamiento de la pared. También se observó una infiltración leucocítica.

Los niveles de tPA hallados presentan un incremento significativo entre 10 y 120 minutos

(media 0,163; mediana 0,145; SD 0,193 a los 10').

(media 0,630; mediana 0,760; SD 0,528 a los 120').

$P=0,018$.

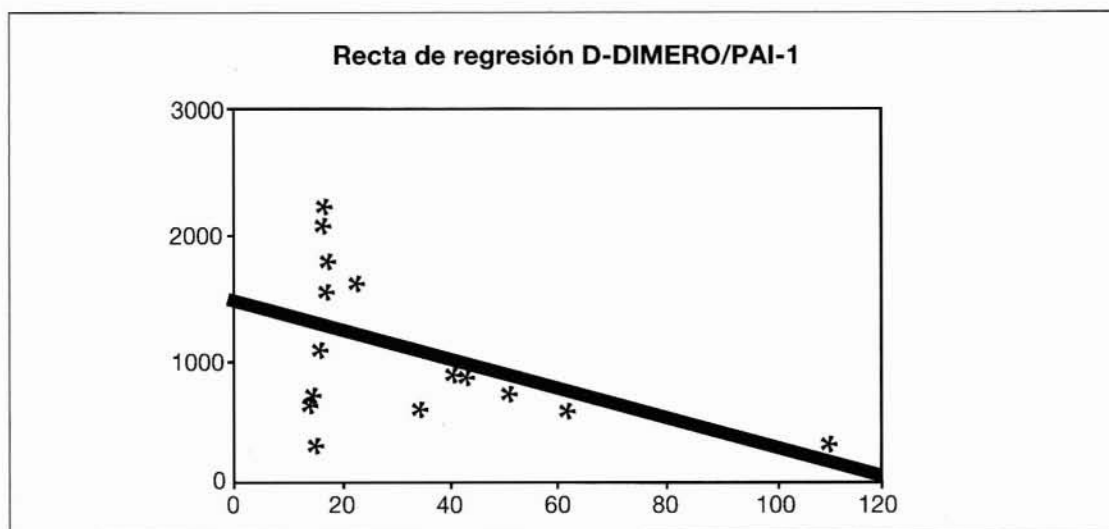


Gráfico 1: Recta de regresión lineal entre Dímero-D y PAI-1 ($r=0,543$ y $p=0,29$).

No se incrementan significativamente los niveles de UK:

(media 0,022; mediana 0,024; SD 0,024 a los 10').
(media 0,027; mediana 0,023; SD 0,030 a los 120').
 $P=0,14$.

Tampoco se incrementan significativamente los niveles de PAI-1:

(media 1,72; mediana 0,485; SD 2,78 a los 10').
(media 1,94; mediana 0,490; SD 3,98 a los 120').
 $P=0,37$.

Aunque los niveles de tPA se incrementen de modo significativo, los niveles a los 10' son mucho más bajos que los considerados como normales (1,12 ng/ml/mg tejido). Acercándose a la normalidad tras 120' de incubación.

Los halos de lisis que se obtuvieron tras incubación de fragmentos de pared mostraron actividad fibrinolítica débil, incluso después de 20 horas, si se compara con los que se habían obtenido en arterias sanas, tanto en modelos animales como humanos (en este caso fueron 2 muestras arteriales obtenidas en pacientes traumáticos), aunque no se puede realizar una correlación estadística.

Discusión

Diversos trabajos publicados en la literatura nos muestran que niveles elevados de fibrinógeno aumentan «per se» el riesgo de padecer aterosclerosis (9 y 10), aunque a nivel clínico no se suele considerar con la misma importancia que los otros factores de riesgo clásicos, probablemente debido a la dificultad de controlar sus niveles terapéuticamente.

A nivel experimental, Binni (5), Smith (6), Villaverde (7) y otros autores, han demostrado el importante papel del sistema fibrinógeno/fibrina/lípidos en el desarrollo de las placas aterogénicas en estadios tempranos de aterogénesis. No obstante, algunos autores (11) dudan de si el fibrinógeno es realmente un causante de lesión vascular o bien un simple marcador que se eleva una vez producida la lesión.

Tal como exponemos en nuestros resultados, hemos apreciado que: En el grupo de pacientes con aterosclerosis avanzada ($n=16$), afectados de isquemia crónica en grados III y IV, comparado con el grupo control ($n=17$) existe un incremento en los niveles plasmáticos de fibrinógeno. Este incremento podría darse por: a) aumento de su síntesis (niveles aumentados de IL-6) o b) disminución de la fibrinólisis (niveles moderadamente altos de PAI-1).

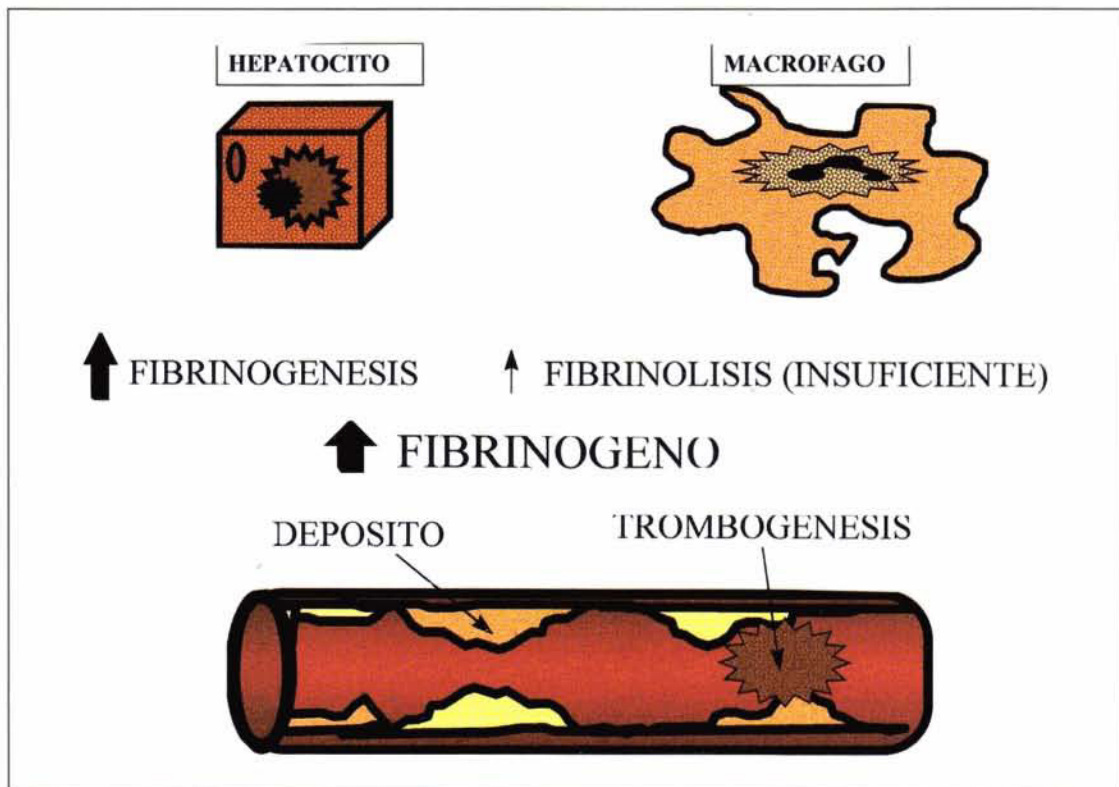
Igual que otros autores (11), pensamos que el fibrinógeno puede usarse como marcador de aterosclerosis y,

además, puede llegar a tener de por sí un papel de causalidad, aunque quedaría pendiente de demostrar en más ensayos clínicos.

En cuanto a los resultados que obtuvimos en el análisis de la actividad de la pared arterial «enferma», pudimos apreciar una escasa actividad fibrinolítica: Únicamente el tPA presentó un incremento significativo en el tiempo, aunque sin llegar a alcanzar niveles considerados como normales (Gráfica II). Los demás factores fibrinolíticos (UK) e inhibidores de la fibrinólisis (PAI-1) no se modificaron significativamente. Todo ello nos

lleva a decidir que la pared arterial aterosclerosa presenta una pobre actividad en esta fase avanzada de lesión, corroborándose tras el análisis de la superficie de los halos de lisis que se obtuvieron por fragmentos de pared.

Por todo ello, creemos que en estudios avanzados de arteriosclerosis el sistema del fibrinógeno y su modulación están más implicados como factores aterogénicos/trombogénicos desde la óptica plasmática, más que por su participación directa en la pared arterial en estas fases tardías, dada su escasa capacidad moduladora.



Dibujo 1. Nuestra hipótesis respecto a la influencia del fibrinógeno en la aterosclerosis avanzada de miembros inferiores..

BIBLIOGRAFIA

1. KANNEL, W. B.; D'AGOSTINO, R. B.; BELANGER, A. J.: Fibrinogen, cigarette smoking, a risk of cardiovascular disease: Insights from the Framingham study. *Am. Heart J.*, 1987; 258:1183-1186.
2. MEADE, T. W.; MELLOWS, W.; BROZOVIC, M. et al.: Haemostatic function and ischaemic heart disease: Principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*, 1986; 2:533-537.
3. LOW, G. D. O.; SMITH, W. C. S.; TUNSTELL-PEDOE, H. D. et al.: Cardiovascular risk and haemorrhology-results from the Scottish Heart health Study and the MONICA-Project, Glasgow. *Clin. Haemorheol.*, 1988; 8:517-524.
4. FOLSOM, A.: Fibrinogen and cardiovascular risk

- in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) Study. In: ERNST, E.; KOENING, W.; LOW, G. D. O.; MEADE, T. W.; Eds. Fibrinogen, a «New» Cardiovascular Risk Factor. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1992.
5. BINI, A.; FENOGLIO, J.J. J.R.; MESA-TEJADA, R.; KUDRYK, B.; KAPLAN, K. L.: Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1989; 9:109-121.
 6. SMITH, E. B.; KEEN, G. A.; GRANT, A.; STIRK, C.: The fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis*, 1990; 10:263-275.
 7. VILLAVARDE, C. A.: Fibrinógeno como factor de riesgo cardiovascular. Incidencia de los fibratos. *Cardiovascular Risk Factors*, 1994; 3:30-45.
 8. VILLAVARDE, C. A.: Hiperlipemia y co-factores aterógenos relacionados con la hemostasia. *Drugs of Today*, 1988; 24:79-94.
 9. BINDER, R. B.; GEIGER, M.: Possible links between risk factors for cardiovascular disease: Fibrinogen, endothelial cells, coagulation and fibrinolysis. Fibrinogen: A New Cardiovascular Risk Factor, Vienna. Edited by E. ERNST, W. KOENING, G. D. O. LOWE and T. W. MEADE, 1992; 19-26.
 10. ERNST, E.: Plasma fibrinogen - an independent cardiovascular risk factor. *Journal of Internal Medicine*, 1990; 227:365-372.
 11. VASSE, M.; COLLET, J. P.; SORIA, J.; MIRSHAHI, S. S.; VANNIER, J. P.; SORIA, C.: Fibrinogen a vascular risk factor: A simple marker or a real cause of vascular lesion? *Thrombosis Research*, 1994; 75:349-352.