

Activador tisular del plasminógeno: Mecanismo de acción y propiedades trombolíticas

J.A. PARAMO*, D. COLLEN**

INTRODUCCION

Los activadores del plasminógeno son una clase de serina proteasas que convierten, mediante proteólisis limitada, un zimógeno circulante, el plasminógeno, en una proteasa tripsina-like, la plasmina (31). Además, los activadores del plasminógeno presumiblemente juegan un importante papel en varios procesos en los que tiene lugar proteólisis extracelular como diferenciación terminal, remodelación tisular y transformación maligna (42), ovulación y embrioinplantación (54).

Las primeras observaciones acerca del origen tisular de ciertos activadores de la fibrinolisis datan de 1930 a partir de los trabajos de Fisher (18) quien demostró que ciertos cultivos de células normales y neoplásicas podían licuar coágulos de fibrina. En 1947 Astrup y Permin (1) comprueban que ciertos tejidos animales contienen un agente capaz de activar el plasminógeno al que se denominó fibrinokinasas. Posteriormente Williams (63) demostró la existencia de un activador del plasminógeno en la orina, conocido como uroquinasa, y Müllertz (33) encontró un activador en la sangre, ahora llamado activador del plasminógeno sanguíneo o vascular. Los activadores del plasminógeno pueden obtenerse a partir de cultivos celulares procedentes de tejidos normales y tumorales y también han sido hallados en fluidos biológicos. Inicialmente se han denominado en relación al tejido de origen.

En los mamíferos los activadores del plasminógeno están representados por dos familias de enzimas: una de ellas relacionada con el enzima urinario uroquinasa (u-PA) y la otra con el llamado activador tisular del plasminógeno (tissue-type plasminogen activator, t-PA).

La importancia fisiopatológica del t-PA deriva del papel que el descenso de la actividad fibrinolítica puede jugar en la patogénesis de la enfermedad trombotica y/o aterosclerótica (38, 39).

Todos los activadores del plasminógeno estudiados hasta la actualidad ejercen su acción por hidrólisis del enlace Arg₅₆₀-Val₅₆₁ en la molécula del plasminógeno (8).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL t-PA

Los t-PA se hallan presentes en muchos órganos, tejidos y secreciones, pero su concentración varía considerablemente. Se han encontrado niveles relativamente altos en útero, corazón, músculo estriado, riñón, ovario, pulmón, tiroides y nódulos linfoides (31). Asimismo ha podido detectarse actividad fibrinolítica en jugo gástrico y líquido seminal (19). Los t-PA han sido purificados y caracterizados a partir de diversas fuentes, incluyendo corazón de cerdo, tejido vascular postmortem y sangre después de ejercicio físico (8, 31), así como cultivos de células endoteliales (25, 51). La primera purificación satisfactoria a partir de tejido humano ha sido de tejido uterino (44); con un antisuero obtenido tras inmunización con este activador se ha podido demostrar que el activador extraído de tejidos humanos, el activador vascular y el activador sanguíneo son similares desde el punto de vista inmunológico, pero diferentes de la uroquinasa (45). Ello induce a pensar que el activador sanguíneo es el mismo activador vascular liberado al torrente circulatorio por acción de diversos estímulos (8). El t-PA también se ha aislado en cantidades relativamente importantes a partir de cultivo de células de melanoma humano (46). Este activador es inmunológicamente indistinguible del activador aislado a partir de útero humano (9, 46, 61).

Recientemente, el gen que expresa el t-PA ha sido clonado e insertado en *Escherichia Coli* mediante técnicas del DNA recombinante (40). Ello permite la obtención de importantes cantidades abriendo perspectivas optimistas para su aplicación terapéutica. El t-PA recombinante (Rec-t-PA)

*Servicio de Hematología, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, España. **Center for Thrombosis and Vascular Research, Department of Medical Research, University of Leuven, Belgium.

es indistinguible del activador natural aislado de las células de melanoma humano, tanto desde el punto de vista bioquímico como en lo que respecta a turnover y efecto trombolítico específico (13, 56).

El t-PA es una glicoproteína de cadena única con un peso molecular aproximado de 63.000 que contiene 527 aminoácidos (40). El activador de una cadena es una serina proteasa activa, como lo demuestra su capacidad para incorporar diisopropilfluorofosfato radiactivo (^3H -DFP), y contiene dos "kringle", estructuras homólogas a las encontradas en el plasminógeno (40).

Por acción plasmínica limitada dicha molécula es convertida en activador de doble cadena conectada por puentes disulfuro (46, 60). Ello se produce por escisión del enlace $\text{Arg}_{275}\text{-Ile}_{276}$ y formación de una cadena pesada (Pm 31.000), derivada del extremo NH_2 -terminal de la molécula, y una cadena ligera (Pm 28.000) procedente de la región COOH -terminal (37).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las dos formas de t-PA tienen propiedades fibrinolíticas y trombolíticas similares (47, 60); se ha sugerido que sobre la superficie de la fibrina el activador de una cadena es rápidamente convertido en activador de doble cadena (47). Sin embargo, en el momento actual no está claro el papel que esta conversión puede jugar en la regulación de la fibrinólisis.

MECANISMO DE ACCION

Una propiedad importante del t-PA es su específica afinidad por la fibrina. El t-PA es un débil enzima en ausencia de fibrina, pero la fibrina incrementa enormemente el grado de activación del plasminógeno (5, 27, 59).

La activación del plasminógeno por t-PA obedece a la cinética de Michaelis-Menten con $K_m = 65 \mu\text{M}$ en ausencia de fibrina y $K_m = 0,16 \mu\text{M}$ en su presencia (20). Estos datos indican que la fibrina aumenta el grado de activación del plasminógeno por t-PA porque incrementa la afinidad del t-PA ligado a la fibrina y no por influenciar la eficacia catalítica del enzima. Los datos proporcionados por los estudios cinéticos sugieren la absorción de t-PA y plasminógeno al coágulo de fibrina de un modo secuencial con la formación de un complejo ternario. La fibrina incrementaría la concentración local de plasminógeno al crear una interacción adicional entre éste y el t-PA (20). De esta forma el proceso fibrinolítico sería desencadenado por la fibrina y estaría localizado en su superficie.

La activación del plasminógeno por t-PA también se ve potenciada por monómeros de fibrina y fragmentos de fibrinógeno tras digestión por CNBr (29, 34) lo que sugiere que la estructura polimérica de la fibrina no es un requisito para la estimulación.

LIBERACION DEL t-PA AL TORRENTE CIRCULATORIO

Aunque existen poderosos argumentos que sugieren que el t-PA circulante deriva de las células endoteliales (8, 51) el mecanismo que controla su liberación no ha sido suficientemente aclarado. Numerosas drogas vasoactivas tales como adrenalina, ácido nicotínico, histamina, vasopresina y análogos como 8-D-Arginina-Vasopresina (DDAVP) aumentan la actividad fibrinolítica sanguínea, pero su efecto es de escasa duración (19, 36). Algunos esteroides anabolizantes como etilestrenol o estanozolol incrementan tanto la síntesis como la liberación de activador del plasminógeno desde la pared vascular (35). Stress, ejercicio físico y oclusión venosa estimulan la actividad fibrinolítica plasmática (8, 19). Dado que la mayoría de estos estímulos provocan liberación de catecolaminas, se ha sugerido que estas hormonas pueden representar uno de los principales mecanismos de control de liberación de t-PA. Sin embargo, la falta de correlación entre la liberación de catecolaminas y t-PA en respuesta al ejercicio físico y electroshock sugiere mecanismos de control adicionales. Cash ha pensado en una regulación neurohormonal de la liberación de t-PA (6). El ha sugerido que la secreción de t-PA al torrente circulatorio estaría modulada por una hormona peptídica central (plasminogen activator releasing hormone, PARH) estructuralmente similar a la vasopresina, sintetizada en la región hipotálamo-hipofisaria. La PARH sería la responsable de la liberación de t-PA desde el endotelio mientras que la vía catecolamínica estaría implicada en situaciones de stress intenso (6, 8). Sin embargo, un reciente estudio no ha podido evidenciar la existencia de una hormona específica, diferente de la vasopresina, responsable de la liberación de t-PA (15).

Se ha postulado un mecanismo de control adicional a raíz de la observación de que la proteína C activada (la forma activa de una proteína plasmática vitamin-K-dependiente) de origen bovino es capaz de incrementar la liberación de t-PA en perros (16). Sin embargo, estudios llevados a cabo en primates utilizando proteína C humana han cuestionado el papel de este enzima en el control de la liberación de t-PA (14).

Algunos autores han pensado que cambios en la motilidad vascular serían responsables de la liberación de t-PA en determinadas situaciones (19).

En conclusión, el mecanismo que controla la liberación de t-PA desde las células endoteliales precisa una mayor clarificación.

MECANISMO DE INHIBICION DEL t-PA EN LA SANGRE

Los mecanismos por los que el t-PA es aclarado de la sangre son múltiples y no bien conocidos (10). El hígado juega un importante papel en este clearance resultando una vida media para el t-PA de escasos minutos (23).

Se han encontrado inhibidores fibrinolíticos en extractos de células endoteliales humanas a los que se ha atribuido el descenso de la actividad t-PA (26, 28). La detección de complejos t-PA-inhibidor ha podido evidenciarse con técnicas inmunoradiométricas; en sujetos normales pueden existir diversas formas moleculares de t-PA circulante: fracción libre y formas de alto peso molecular identificadas como complejos t-PA- α_2 antiplasmina y t-PA- α_1 antitripsina (49). En diversas situaciones patológicas (infarto de miocardio, trombosis, etc.) los niveles de t-PA antigénico y complejos de alto peso molecular estaban significativamente elevados (21), pero no pudieron identificarse como complejos t-PA- α_2 antiplasmina o t-PA- α_1 antitripsina, lo que sugería la existencia de otros mecanismos de inhibición. Recientemente se ha podido identificar un rápido y específico inhibidor del t-PA (7) de Pm 50.000 que está presente en muy bajas concentraciones de plasma de sujetos sanos, elevándose en ciertas situaciones clínicas (enfermedad hepática severa, pancreatitis, neoplasia, etc.). No obstante, el exacto papel fisiopatológico de este inhibidor necesita ser establecido.

METODOS PARA LA DETERMINACION DEL t-PA

El t-PA antigénico puede dosificarse con técnicas inmunoradiométricas. El nivel medio de una muestra de plasma obtenida en reposo es de $6,6 \pm 2,9$ ng/ml (48). Similares resultados pueden obtenerse utilizando un radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis (3, 30). Dicho nivel incrementa significativamente tras ejercicio físico, oclusión venosa o infusión de DDAVP (36, 48). Asimismo se han encontrado niveles elevados en situaciones patológicas como infarto de miocardio, cirrosis hepática y tumores malignos (21).

Los métodos para la determinación de t-PA funcionalmente activo se han basado en estimular la activación del plasminógeno por t-PA en presencia de fibrina o de fragmentos obtenidos tras su digestión. Ranby y colab. (41) han descrito un método sensitivo consistente en incubar plasminógeno, t-PA, monómeros de fibrina y un sustrato cromogénico sensible a la plasmina. Este método, que ha demostrado ser sensible en sistemas purificados, debe ser adaptado para su uso en plasma mediante acidificación de las muestras, en orden a destruir inhibidores de proteasas, o bien utilizando la fracción euglobulínica (58, 64). Con este método la actividad plasmática basal es $0,05 \pm 0,03$ UI/ml ($0,2 \pm 0,1$ ng/ml), elevándose a $1,2 \pm 1,2$ UI/ml tras oclusión venosa.

PROPIEDADES TROMBOLITICAS DEL T-PA

La estreptoquinasa y la uroquinasa se utilizan ampliamente como agentes trombolíticos. Ambas carecen de específica afinidad por la fibrina, pues activan el plasminógeno circulante y el ligado a la fibrina de un modo relativamente indiscriminado, induciendo lo que se ha denominado estado lítico sistémico. La plasmina generada en la circulación será inmediatamente neutralizada por la α_2 -antiplasmina y, una vez agotada la capacidad de este inhibidor, varias proteínas plasmáticas serán degradadas por la plasmina (fibrinógeno, Factor V, Factor VIII, etc.) con el consiguiente riesgo hemorrágico. Únicamente puede hablarse de trombolisis específica si el proceso de activación del plasminógeno se localiza sobre la superficie de la fibrina. Ello puede conseguirse con un activador que, como el fisiológico, interaccione con la fibrina activándose in situ. Dicho activador debería reunir una serie de propiedades como ausencia de antigenicidad, selectividad de acción sobre el coágulo para evitar la aparición de un estado lítico sistémico y corta vida media biológica para que la hemostasia pueda normalizarse rápidamente.

El t-PA puede ser obtenido en cantidades significativas a partir del cultivo de células de melanoma. Ello ha permitido conocer las propiedades bioquímicas, biológicas y trombolíticas de este activador que son muy similares a las del activador fisiológico del plasminógeno.

1) *Estudios in vitro*

El efecto trombolítico específico del t-PA sobre coágulos de sangre total o plasma con diferentes grados de fibrina polimerizada se ha evaluado utilizando un sistema compuesto de un coágulo de fibrina marcada con I^{125} suspendido en plasma humano. Cuando se infundían 90 UI/ml de t-PA durante tres horas se conseguía un 95 por ciento de lisis del coágulo en aproximadamente cinco horas sin descenso de los parámetros hemostáticos; dicho grado de lisis no se conseguía cuando se utilizaba una cantidad equivalente de uroquinasa (22). Resultados similares han sido constatados recientemente con Rec-t-PA (13).

El grado de fibrinólisis guarda estrecha relación con la cantidad de t-PA incorporado en el coágulo. Se necesitan menores cantidades de t-PA endógeno (incorporado en el coágulo) que de t-PA exógeno (añadido después de la formación del coágulo) para obtener una lisis eficaz (4, 65). Coágulos formados a partir de plasma previamente depleccionado en α_2 -antiplasmina fueron más fácilmente lisables por t-PA endógeno y exógeno que coágulos de plasma normal (65). En conclusión, no solamente la concentración de t-PA y de su inhibidor son importantes en la regulación de la trombolisis, sino también su distribución tanto en el coágulo como en el plasma circundante.

2) *Estudios in vivo*

— Activador tisular del plasminógeno como agente trombolítico en tromboembolismo venoso. Se ha investigado el efecto trombolítico del t-PA en conejos con embolismo pulmonar experimental (32) y comparado con una dosis equivalente de uroquinasa. El efecto trombolítico del t-PA fue diez veces superior al de la uroquinasa y cursó sin excesiva activación del plasminógeno ni descenso de otros parámetros hemostáticos. El mismo efecto ha podido ponerse de manifiesto en perros con trombosis experimental de la vena femoral (24). La infusión de uroquinasa a una dosis de 2.500 UI/Kg/h durante cuatro horas no indujo significativa lisis comparada con infusión salina y la lisis tras administración de 25.000 UI/Kg/h durante cuatro horas se asoció con un significativo grado de defibrinogénesis. Sin embargo, la infusión de 2.500 UI equivalentes de t-PA/Kg durante cuatro horas causó lisis significativa sin provocar deplección de fibrinógeno.

Similares resultados fueron obtenidos en un modelo de trombosis venosa en conejos (11). Se estudió el efecto trombolítico del t-PA, desde un punto de vista cuantitativo, sobre un trombo radiactivo inducido en un segmento aislado de la vena yugular. La lisis obtenida tras infusión de 100.000 UI t-PA (aproximadamente 1 mg de proteína) fue 75 por ciento para coágulos recientes; el activador de cadena única y el de doble cadena se comportaron de forma similar y la trombolisis no se asoció con fibrinólisis sistémica ya que los niveles de fibrinógeno, plasminógeno y α_2 -antiplasmina no sufrieron alteraciones. La infusión sistemática de uroquinasa provocó significativa trombolisis únicamente a una dosis que se asoció con activación sistémica del plasminógeno.

Utilizando este mismo modelo experimental se ha podido comprobar que Rec-t-PA y melanoma t-PA tienen propiedades trombolíticas muy similares (56).

El t-PA ha sido administrado a dos pacientes con trombosis venosa (62). La infusión intravenosa de 7,5 mg en aproximadamente 24 horas indujo lisis completa de un trombo ileofemoral y renal en un paciente que había recibido un trasplante renal y en otro paciente con síndrome nefrótico y trombosis de vena cava y vena renal derecha. En ambos casos la trombolisis no se asoció con consumo de fibrinógeno, plasminógeno ni α_2 -antiplasmina.

— Trombolisis coronaria con t-PA.

Existen evidencias de que el tratamiento de la fase aguda del infarto de miocardio (IAM) con agentes trombolíticos puede contribuir a una mayor supervivencia en estos pacientes derivada del restablecimiento funcional miocárdico. La administración de trombolíticos en IAM se basa en el hecho de que el mecanismo precipitante más frecuente de infarto agudo transmural es la oclusión trombótica de una arteria coronaria aterosclerótica (17). Si, como es razonable admitir, la reapertura del vaso ocluido permite la recuperación de tejido miocárdico puede deducirse que la trombolisis precoz de una arteria coronaria ocluida conseguirá mejoría de la función miocárdica, reducirá el reinfarcto y probablemente disminuirá la tasa de mortalidad (12). No obstante, es preciso señalar que la trombolisis coronaria no es el punto final del tratamiento, sino que se empleará para prevenir ulterior necrosis y disfunción de las células miocárdicas isquémicas y para recuperar aquellas células no totalmente privadas de sangre.

Varios autores han demostrado que la trombolisis intracoronaria con estreptoquinasa restablece el flujo en aproximadamente el 80 por ciento de los pacientes, hecho constatado angiográficamente (43, 55). También se ha demostrado que la administración sistémica de altas dosis de estreptoquinasa consigue un grado de reperfusión coronaria bastante similar al obtenido por vía intracoronaria (50, 53). Sin embargo, la necesidad de cateterización cardíaca en el primer caso y el riesgo de fibrinólisis sistémica en el segundo constituyen serias desventajas (52).

Utilizando melanoma-t-PA, Bergman y colab. (2) demostraron que la infusión intravenosa de 10.000 UI/min durante 60 min en perros con trombosis coronaria experimental producía lisis en aproximadamente 10 min (angiográficamente constatada) y además restablecía la perfusión miocárdica y reducía el daño metabólico (comprobado con técnicas tomográficas) sin provocar un estado lúctico sistémico. El efecto trombolítico del Rec-t-PA en el mismo modelo experimental fue absolutamente comparable (56).

Recientemente melanoma-t-PA ha sido administrado a siete pacientes con IAM (57). El propósito de este estudio era determinar si la administración intracoronaria o intravenosa de t-PA podía lisisar trombos coronarios sin provocar activación fibrinolítica sistémica. En seis de los siete pacientes se produjo lisis del coágulo (confirmada angiográficamente) sin modificaciones apreciables en los niveles de fibrinógeno, plasminógeno y α_2 -antiplasmina. Sin embargo, un importante grado de estenosis residual persistió en cuatro pacientes y reinfarcto ocurrió en dos. Esta experiencia preliminar sugiere que el t-PA es un agente trombolítico coronario eficaz; su exacta utilidad terapéutica puede radicar en la rapidez con que altas dosis pueden ser administradas por vía sistémica en pacientes con sospecha de IAM.

De los estudios realizados hasta la actualidad se desprende que el t-PA es un potente y selectivo agente trombolítico que puede ser administrado por vía intravenosa sin inducir activación fibrinolítica sistémica. Rec-t-PA puede ser una buena alternativa en el tratamiento trombolítico de pacientes con infarto agudo de miocardio.

REFERENCIAS

1. Astrup, T.; Permin, P.M.: "Fibrinolysis in animal organism". *Nature*, 159: 779, 1947.
2. Bergmann, S.R.; Fox, K.A.A.; Ter-Pogossian, M.M.; Sobel, B.E.; Collen, D.: "Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator". *Science*, 220: 1.181, 1983.
3. Bergsdorf, N.; Nilsson, T.; Wallen, P.: "An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease". *Thromb. Haemost.*, 50: 740, 1983.
4. Brommer, E.J.P.: "The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting as a determinant of the rate of fibrinolysis; inefficiency of activators added afterwards". *Thromb. Res.*, 34: 109, 1984.
5. Camiolo, S.M.; Thorsen, S.; Astrup, T.: "Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase activated human globulin, and plasmin". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138: 277, 1971.
6. Cash, J.D.: "Control mechanisms of activator release". In: *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis vol. 3* (Davidson, J.F.; Rowan, R.M.; Samama, M.M.; Desnoyers, P.C.; eds) Raven Press, New York, p. 65, 1978.
7. Chmielewska, J.; Ranby, M.; Wiman, B.: "Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma". *Thromb. Res.*, 31: 427, 1983.
8. Collen, D.: "On the regulation and control of fibrinolysis". *Thromb. Haemostas.*, 43: 77, 1980.
9. Collen, D.; Rijken, D.C.; Van Damme, J.; Billiau, A.: "Purification of human tissue-type plasminogen activator in centigram quantities from human melanoma cell culture fluid and its conditioning for use in vivo". *Thromb. Haemostas.*, 48: 294, 1982.
10. Collen, D.: "Mechanisms of inhibition of tissue-type plasminogen activator in blood". *Thromb. Haemostas.*, 50: 678, 1983.
11. Collen, D.; Stassen, J.M.; Verstraete, M.: "Thrombolysis with human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in rabbits with experimental jugular vein thrombosis". *J. Clin. Invest.*, 71: 368, 1983.
12. Collen, D.; Verstraete, M.: "Systemic thrombolytic therapy of acute myocardial infarction?". *Circulation*, 68: 462, 1983.
13. Collen, D.; Stassen, J.M.; Marafino, B.J.; Builder, S.; De Cock, F.; Ogez, J.; Tajiri, D.; Pennica, D.; Bennet, W.F.; Salwa, J.; Hoyng, C.F.: "Biological properties of human tissue-type plasminogen activator by expression of recombinant DNA in mammalian cells". *J. Pharm. Exper. Ther.* (submitted).
14. Colucci, M.; Stassen, J.M.; Collen, D.: "Influence of protein C activation on blood coagulation and fibrinolysis in squirrel monkeys". *J. Clin. Invest.* (in press).
15. Colucci, M.; Stassen, J.M.; Salwa, J.; Collen, D.: "Identification of plasminogen activator releasing activity in the neurohypophysis". *Br. J. Haematol.* (in press).
16. Comp, P.C.; Esmon, C.T.: "Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs". *J. Clin. Invest.*, 68: 1.221, 1981.
17. Dewood, M.A.; Spores, J.; Notske, R.; Mouser, L.T.; Burroughs, R.; Golden, M.S.; Lang, H.T.: "Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction". *N. Engl. J. Med.*, 303: 897, 1980.
18. Fisher, A.: "Gewebezuchtung. Håndbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro". Munich: Müller-Steinicke, 1930.
19. Hedner, U.; Nilsson, I.M.: "The role of fibrinolysis". *Clinics in Haematology*, 10: 327, 1981.

20. Hoylaerts, M.; Rijken, D.C.; Lijnen, H.R.; Collen, D.: "Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin". *J. Biol. Chem.*, 257: 2,912, 1982.
21. Juhan-Vague, I.; Rijken, D.C.; De Cock, F.; Méndez, C.; Collen, D.: "Extrinsic plasminogen activator levels in clinical plasma samples". In: *Progress in Fibrinolysis*, Vol. VI (Davidson, J.F.; Bachmann, F.; Bouvier, C.A.; Kruthof, E.K.O., eds). Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 65, 1983.
22. Korninger, C.; Collen, D.: "Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro". *Thromb. Haemostas.*, 46: 561, 1981.
23. Korninger, C.; Stassen, J.M.; Collen, D.: "Turnover of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in rabbits". *Thromb. Haemostas.*, 46: 658, 1981.
24. Korninger, C.; Matsuo, O.; Suy, R.; Stassen, J.M.; Collen, D.: "Thrombolytic properties of purified tissue plasminogen activator in a dog femoral vein thrombosis model". *J. Clin. Invest.*, 69: 573, 1982.
25. Levin, E.G.; Loskutoff, D.J.: "Comparative studies of the fibrinolytic activity of cultured vascular cells". *Thromb. Res.*, 15: 869, 1979.
26. Levin, E.G.: "Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: Evidence for an enzyme-inhibitor complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6,804, 1983.
27. Lijnen, H.R.; Collen, D.: "Tissue-type plasminogen activator: Properties and mechanism of action" (in press).
28. Loskutoff, D.J.; Edgington, T.S.: "An inhibitor of plasminogen activator in rabbit endothelial cells". *J. Biol. Chem.*, 256: 4,142, 1981.
29. Lucas, M.A.; Straight, D.L.; Fretto, L.J.; McKee, P.A.: "The effects of fibrinogen and its cleavage products on the kinetics of plasminogen activation by urokinase and subsequent plasmin activity". *J. Biol. Chem.*, 258: 12,171, 1983.
30. Macgregor, I.R.; Prowse, C.V.: "Tissue plasminogen activator in human plasma measured by radioimmunoassay". *Thromb. Res.*, 31: 461, 1983.
31. Marsh, N.A.: "Plasminogen and plasminogen activators". In: "Fibrinolysis" (Marsh, N.A., ed). J. Wiley and Sons, New York, p. 18, 1981.
32. Matsuo, O.; Rijken, D.C.; Collen, D.: "Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus". *Nature*, 291: 590, 1981.
33. Müllertz, S.: "Plasminogen activator in spontaneously active human blood". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82: 291, 1953.
34. Nieuwenhuizen, W.; Verheijen, J.H.; Vermond, A.; Chang, C.T.G.: "Plasminogen activation by tissue activator is accelerated in the presence of fibrin (ogen) cyanogen bromide fragment FCB-2". *Biochim. Biophys. Acta*, 755: 531, 1983.
35. Nilsson, I.M.: "Effect of drugs on activator synthesis and release". In: "Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis, Vol. 3". (Davison, J.F.; Rowan, R.M.; Samama, M.M.; Descroyers, P.C., eds). Raven Press, New York, p. 77, 1978.
36. Nilsson, I.M.; Mikaelsson, M.; Vilhardt, H.: "The effect of intranasal DDAVP on coagulation and fibrinolytic activity in normal persons". *Scan. J. Haematol.*, 29: 70, 1982.
37. Ogston, D.; Bennett, B.: "Surface-mediated reactions in the formation of thrombin, plasmin and kallikrein". *Br. Med. Bull.*, 34: 107, 1978.
38. Pandolfi, M.; Isacson, S.; Nilsson, I.M.: "Low fibrinolytic activity in the walls of veins of patients with thrombosis". *Acta Med. Scand.*, 186: 1, 1969.
39. Peabody, R.A.; Tsapogas, M.J.; Wu, K.T.: "Altered endogenous fibrinolysis and biochemical factors in atherosclerosis". *Arch. Surg.*, 109: 309, 1974.
40. Pennica, D.; Holmes, W.E.; Kohr, W.J.; Harkins, R.N.; Vehar, G.A.; Ward, C.A.; Bennett, W.F.; Yelverton, E.; Seeburg, P.H.; Heyneker, H.L.; Goeddel, D.V.; Collen, D.: "Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator in *E. Coli*". *Nature*, 301: 214, 1983.
41. Ranby, M.; Norman, B.; Wallén, P.: "A sensitive assay for tissue plasminogen activator". *Thromb. Res.*, 27: 743, 1982.
42. Reich, E.: "Plasminogen activator: secretion by neoplastic cells and macrophages". In: "Proteases and Biological Control" (Reich, E.; Rifkin, D.B.; Shaw, E., eds). Cold Spring Harbor Laboratory, p. 333, 1975.
43. Rentrop, P.; Blanke, H.; Karsch, K.R.; Kaise, H.; Kösterling, H.; Letiz, K.: "Selective intracoronary thrombolysis in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris". *Circulation*, 63: 307, 1981.
44. Rijken, D.C.; Wijngaards, G.; Zaal-De, Jong, M.; Welbergen, J.: "Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue". *Biochim. Biophys. Acta*, 580: 140, 1979.
45. Rijken, D.C.; Wijngaards, G.; Welbergen, J.: "Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood an vascular wall". *Thromb. Res.*, 18: 815, 1980.
46. Rijken, D.C.; Collen, D.: "Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture". *J. Biol. Chem.*, 256: 7,035, 1981.
47. Rijken, D.C.; Hoylaerts, M.; Collen, D.: "Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator". *J. Biol. Chem.*, 257: 2,920, 1982.

48. Rijken, D.C.; Juhan-Vague, I.; De Cock, F.; Collen, D.: "Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two-site immunoradiometric assay". *J. Lab. Clin. Med.*, 101: 274, 1983.
49. Rijken, D.C.; Juhan-Vague, I.; Collen, D.: "Complexes between tissue-type plasminogen activator and proteinase inhibitors in human plasma identified with an immunoradiometric assay". *J. Lab. Clin. Med.*, 101: 285, 1983.
50. Schröder, R.; Biamino, G.; von Leitner, E.R.; Linderer, T.; Brüggemann, T.; Heitz, J.; Vöhringer, H.F.; Wegsheider, K.: "Intravenous short term infusion of streptokinase in acute myocardial infarction". *Circulation*, 67: 536, 1983.
51. Shepro, D.; Schleef, R.; Hechtman, H.B.: "Plasminogen activator activity by cultured bovine aortic endothelial cells". *Life Sci.*, 26: 415, 1980.
52. Sobel, B.E.; Bergmann, S.R.: "Coronary thrombolysis: some unresolved issues". *Am. J. Med.*, 72: 1, 1982.
53. Spaan, J.F.; Sherry, S.; Carabello, B.A.; Denenberg, B.S.; Mann, R.H.; Mc Cann, W.D.; Gault, J.H.; Gentiler, R.D.; Belber, A.D.; Maurer, A.H.; Cooper, E.M.: "Coronary thrombolysis by intravenous streptokinase in acute myocardial infarction: acute and follow-up studies". *Am. J. Cardiol.*, 53: 655, 1984.
54. Strickland, S.: "Studies on the role of plasminogen activator in ovulation and early embryogenesis". In: "Regulatory Proteolytic Enzymes and their Inhibitors" (Magnusson, S.; Ottessen, M.; Foltman, B.; Dano, K.; Neurath, H., eds). Pergamon Press, Oxford, p. 181, 1978.
55. Tennant, S.N.; Dixon, J.; Venable, T.C.; Page, H.L.; Roach, A.; Kaiser, A.B.; Frederiksen, R.; Tacogue, L.; Kaplan, P.; Babu, N.S.; Anderson, E.E.; Wooten, E.; Jennings, H.S.; Breinig, J.; Campbell, B.: "Intracoronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction: comparison of the efficacy of urokinase with streptokinase". *Circulation*, 69: 756, 1984.
56. Van de Werf, F.; Bergmann, S.R.; Fox, K.A.A.; De Geest, H.; Sobel, B.E.; Collen, D.: "Coronary thrombolysis in dogs with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology". *Circulation*, 69: 605, 1984.
57. Van de Werf, F.; Ludbrook, P.A.; Bergman, S.R.; Tiefenbrum, A.J.; Fox, K.A.A.; De Geest, H.; Verstraete, M.; Collen, D.; Sobel, B.E.: "Coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction". *N. Engl. J. Med.*, 310: 609, 1984.
58. Verheijen, J.M.; Mullaart, E.; Chang, C.T.G.; Kluff, C.; Wijngaards, G.: "A simple, sensitive spectrophotometric assay for extrinsic (tissue-type) plasminogen activator applicable to measurements in plasma". *Thromb. Haemost.*, 48: 266, 1982.
59. Wallén, P.: "Activation of plasminogen with urokinase and tissue activator". In: "Thrombosis and Urokinase" (Paoletti, R.; Sherry, S.; eds). Academic Press, London, p. 91, 1977.
60. Wallén, P.; Bergsdorf, N.; Ranby, M.: "Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin". *Biochim. Biophys. Acta*, 719: 318, 1982.
61. Wallén, P.; Pohl, G.; Bergsdorf, N.; Ranby, M.; Jormvall, H.: "Purification and characterization of a melanoma cell plasminogen activator". *Eur. J. Biochem.*, 132: 681, 1983.
62. Weimar, W.; Stibbe, J.; Van Seyen, A.J.; Billiau, A.; De Somer, P.; Collen, D.: "Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator". *Lancet*, ii: 1,017, 1981.
63. Williams, J.R.B.: "The fibrinolytic activity of urine". *Br. J. Exper. Pathol.*, 32: 530, 1951.
64. Wiman, B.; Mellbring, G.; Ranby, M.: "Plasminogen activator release during venous stasis as determined by a new specific assay". *Clin. Chim. Acta*, 127: 279, 1983.
65. Zamarron, C.; Lijnen, H.R.; Collen, D.: "Influence of exogenous and endogenous tissue-type plasminogen activator on the lysability of clots in a plasma milkew *in vitro*". *Thromb. Res.* (in press).