

11218
2ej.
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios Superiores



HEMOSTASIA Y GLUCOSILACION PROTEICA

**INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIVISION DE ENSEÑANZA**

TRABAJO DE INVESTIGACION
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA
PRESENTA EL MEDICO CIRUJANO

GUILLERMO JOSE RUIZ ARGUELLES

**TESIS CON
TITULO DE GRADUACION**

MEXICO, D.F. FEBRERO 1982



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCION

Los tratados clásicos de hematología no abordan los problemas hematológicos de los diabéticos en estado hiperglucémico (1). Aún cuando Virchow hace alusión a cambios morfológicos en los eritrocitos en medios con niveles elevados de glucosa, no menciona a la diabetes en su clásica "Patología Celular" (2). El manual de diabetes de Joslin (3), ampliamente difundido ni siquiera menciona al sistema hematológico. Por razones desconocidas, la diabetología había olvidado a la hematología para apoyarse en su avasalladora evolución.

Gracias al advenimiento de determinaciones químicas y funcionales cada vez más sofisticadas y precisas, se han documentado en la sangre de pacientes diabéticos numerosas anomalías, algunas de ellas relacionadas con las alteraciones anatómicas y funcionales de estos enfermos. Recientemente se han analizado las alteraciones hematológicas en diabetes mellitus (1) que se han encontrado tanto en los elementos formes como en el plasma de los enfermos diabéticos. De manera resumida, puede afirmarse que los estudios de los eritrocitos y de la formación de las hemoglobinas glucosadas han permitido documentar de manera más precisa un modelo de reacción no enzimática post-sintética de modificación estructural de las proteínas que en ciertas condiciones han explicado algunas de las secuelas de la diabetes; se ha encontrado que la afinidad por el oxígeno de la sangre de pacientes diabéticos es anor--

mal debido a la glucosilación de la hemoglobina, a la existencia de niveles anormalmente elevados de 2-3 difosfoglicerato y a la disminución de los niveles de fósforo inorgánico (1). Por otro lado, la viscosidad de la membrana del eritrocito en diabéticos se encuentra aumentada durante la hiperglucemia y de manera secundaria, la sobrevida eritrocítica se ha encontrado disminuida. En los leucocitos polimorfonucleares se han encontrado anormalidades funcionales relativas a la adherencia, quimiotaxis, migración inespecífica, fagocitosis y capacidad bactericida. Los linfocitos de enfermos diabéticos tienen alteraciones metabólicas, de respuesta a diversos mitógenos y de superficie celular; estas alteraciones se han encontrado tanto en diabetes espontánea como en diabetes experimental. Algunas subpoblaciones de linfocitos son particularmente vulnerables a los cambios en cifras de glucemia (1).

Desde el punto de vista hemostático, las alteraciones que se han encontrado en diabéticos suponen cambios en las fases vascular, plaquetaria y plasmática (1). Las alteraciones macro y microvasculares son bien conocidas en diabetes y su causa precisa, a pesar de grandes avances, permanece desconocida; algunas evidencias recientes sugieren que las fases plaquetaria y plasmática de la coagulación pueden estar involucradas en su génesis. Las plaquetas de los diabéticos son más adhesivas y agregantes que las de sujetos normales (por numerosas razones: Síntesis exagerada de tromboxano A₂, síntesis disminuida de prostaciclina, aumento en niveles de somatotrofina y de frac-

ción Von Willebrand de factor VIII, generación incrementada de factor 3 plaquetario y de actividad anti-heparina plaquetaria (Factor 4), síntesis aumentada de beta-tromboglobulina, etc). En la fase fluida de la coagulación se han encontrado también numerosas alteraciones: todas ellas sugieren la existencia de un estado de "hipercoagulabilidad" y de disminución de la fibrinolisis. A pesar de estas evidencias, no ha podido establecerse con detalle la relación entre estas alteraciones y el desarrollo de complicaciones en diabetes mellitus; como recientemente se ha revisado (1).

La glucosilación no enzimática de péptidos en diabetes mellitus es un fenómeno cada vez más conocido, capaz de involucrar a diversas proteínas y de modificar en algunos casos la función de las mismas; el fenómeno y su relevancia en la diabetes ha sido objeto de una revisión detallada y de numerosas publicaciones (4).

Con el objeto de analizar la interrelación de algunas de las alteraciones hemostáticas en diabetes mellitus con el fenómeno de glucosilación proteica, en los departamentos de Hematología y Diabetología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" se realizaron varios estudios prospectivos; los hallazgos de los mismos son el motivo de esta comunicación. Para efectos didácticos, se han dividido en cinco partes:

Parte I Desarrollo de una técnica para determinación de hemoglobinas glucosadas.*

- PARTE II: Estudio de alteraciones hemostáticas de las fases fluida y plaquetaria de la coagulación en pacientes diabéticos y sujetos normales.**
- PARTE III: Estudio de la glucosilación del fibrinógeno en diabetes mellitus humana.***
- PARTE IV: Estudio de las interacciones plaquetas-fibrinógeno durante la agregación plaquetaria inducida por ADP en pacientes diabéticos y sujetos normales.****
- PARTE V: Estudio de la glucosilación de las proteínas plaquetarias en pacientes diabéticos y sujetos normales.
- *****

Estas cinco partes, íntimamente ligadas entre sí, se describirán y discutirán de manera independiente.

PARTE I. DESARROLLO DE UNA TECNICA PARA DETERMINACION DE HEMOGLOBINAS GLUCOSADAS (6).

La determinación de las hemoglobinas glucosadas no se hacía en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Basados en la técnica de Trivelli y cols. (5), se desarrolló una microtécnica para determinar los niveles de hemoglobinas glucosadas mediante cromatografía en columna de intercambio iónico utilizando una resina más accesible a nuestro medio y de preparación más sencilla. La técnica, publicada previamente (6), tiene reproducibilidad, precisión y exactitud adecuadas; se describe y discute en la publicación previa. El método permite medir adecuadamente los niveles de hemoglobinas glucosadas.

- * Presentado en la XIII Jornada Anual de la Federación Mexicana de Asociaciones, Sociedades y Colegios de Patología Clínica de México, A.C. Cholula, Puc. Febrero 1981 y publicado en 6.

- ** Presentado en la XXI Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. Acapulco, Gro. Noviembre 1980, y publicado en 7.

- *** Presentado en la XXII Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. Culiacán, Sin. Noviembre 1981, y publicado como RESUMEN en 27.

- **** Presentado en la XXII Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. Culiacán, Sin. Noviembre de 1981.

- ***** Presentado en la XXII Jornada Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. Culiacán, Sin. Noviembre de 1981.

PARTE II. ESTUDIO DE ALTERACIONES HEMOSTATICAS
DE LAS FASES FLUIDA Y PLAQUETARIA DE LA COAGU-
LACION EN PACIENTES DIABETICOS Y SUJETOS NORMA
LES (7).

De manera prospectiva, estudiamos a 42 pacientes diabé-
ticos y 20 sujetos normales, analizando los siguientes parámetros
hemostáticos: Niveles de fibrinógeno, tiempo de trombina, tiempo
total de agregación plaquetaria inducida por epinefrina, porcenta
je de auto-agregación plaquetaria espontánea y tiempo de retardo
de aparición de la segunda onda de agregación plaquetaria al indu
cirse ésta con epinefrina. Además de estos parámetros de coagula
ción, estudiamos los niveles de hemoglobina glucosada, éstos últi
mos por medio de la técnica descrita con anterioridad (6). Los -
resultados de este estudio han sido ya publicados con anteriori--
dad (7) y se resumen en la tabla 1; los niveles de fibrinógeno --
fueron significativamente más altos en pacientes diabéticos que -
en sujetos normales, los tiempos de trombina fueron significativa
mente más cortos en diabéticos tipo II (no insulino-dependientes)
que en sujetos normales. El tiempo de retardo de aparición de la
segunda onda de agregación plaquetaria durante ésta al inducirse
con epinefrina fue significativamente más corto en diabéticos ti
po I (insulino-dependientes) que en sujetos normales y los porcen
tajes de autoagregación plaquetaria espontánea fueron significati
vamente más altos en diabéticos tipo II que en sujetos normales.

Los datos, de manera global, sugirieron, al igual que publicaciones previas, un estado de "hipercoagulabilidad" en los diabéticos. Al hacer además un análisis de regresión lineal simple, se encontró que algunos de los datos de "hipercoagulabilidad" encontrados en los enfermos estudiados tuvieron relación con manifestaciones de control de la diabetes como fueron los niveles de hemoglobina glucosada y las cifras de glucemia; encontramos además que el tiempo de evolución de la diabetes tuvo relación con estas alteraciones hemostáticas. La presentación detallada de los datos y su discusión se han descrito con anterioridad (7).

PARTE III: ESTUDIO DE LA GLUCOSILACION DEL FIBRINOGENO EN DIABETES MELLITUS HUMANA (27).

La glucosa es capaz de adicionarse de manera no-enzimática a numerosas proteínas; la glucosilación proteica depende de numerosas variables entre las que se encuentran la concentración de glucosa y el tiempo de exposición del péptido a ella (8-12). Se ha descrito con anterioridad la glucosilación de proteínas con recambio metabólico acelerado, que es mayor en pacientes diabéticos (11, 12).

Las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno se han encontrado aumentadas en pacientes diabéticos (7, 13, 14). Sin embargo, esta "hiperfibrinogenemia" no es tan marcada cuando, en lugar de medir al fibrinógeno a través de su capacidad coagulante, éste se mide a través de sus propiedades inmunocuif

micas (13). Hemos encontrado previamente que los tiempos de conversión del fibrinógeno a fibrina en presencia de trombina (tiempo de trombina) son más cortos en pacientes diabéticos - que en sujetos normales e inversamente proporcionales a los niveles de fibrinógeno (7); algunos autores habían hecho la primera observación en plasma diluido de pacientes diabéticos (15). Por otro lado, se ha descrito que la vida media del fibrinógeno en pacientes diabéticos es más corta durante la hiperglucemia y que se normaliza al lograrse la euglucemia (16). Estas observaciones sugieren que la molécula del fibrinógeno puede ser funcionalmente distinta en los pacientes diabéticos, y nos condujeron a explorar la posibilidad de algún cambio molecular en el fibrinógeno de los pacientes diabéticos que pudieran explicar los cambios en algunas de sus propiedades funcionales. Decidimos explorar la posibilidad de que el fibrinógeno de los pacientes diabéticos estuviera glucosado.

MATERIAL Y METODOS

Se purificó fibrinógeno de cuatro pacientes diabéticos y cuatro sujetos normales mediante el método de precipitaciones seriadas con glicina descrito por Silberstein y Cols. (17). La pureza de la proteína obtenida se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamina a pH 7.0 con dodecil-sulfato de sodio, inmunoelectroforesis usando suero de conejo anti-fibrina (obsequio del Dr. Guillermo Rufz-Reyes de los Laboratorios Clínicos de Puebla) y suero de conejo anti-proteínas séricas totales; las propiedades funcionales de la proteína se analizaron mediante su coagulabilidad (18), contenido de fibrinógeno coagulable (19) y tiempos de protrombina, trombina y parcial de tromboplastina. Se estudió además la capacidad de generación del cromógeno 5-hidroxi-metil-furfural (5-HMF) en el fibrinógeno completo de un sujeto diabético y un sujeto normal, de acuerdo al método de Fluckiger y Winterhalter (20). Se realizó además cromatografía en columnas de carboxi-metil-celulosa usando buffer de acetato de sodio pH 4.65 con un gradiente de molaridad de 0.01 a 0.5 de acuerdo al método de Day y cols. (21) en el fibrinógeno purificado de 3 pacientes diabéticos y 3 sujetos normales. Se obtuvieron fracciones de 3 ml. y se midieron a 280 nm para evaluar la cantidad total de proteína. Se midió además la generación de 5-HMF en las fracciones obtenidas de la columna y la generación del cromógeno se expresó por el cociente densidad óptica a 443 nm (5HMF) densidad óptica a 280 nm. Se realizó además inmunoelectroforesis con suero de -

conejo anti-fibrina en las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico, después de haberlas concentrado 10 veces mediante diálisis contra Fycoll (R).

RESULTADOS

El fibrinógeno precipitado con glicina tanto de los diabéticos como de los sujetos normales mostró tres bandas en la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio, correspondientes a las cadenas A-alfa, B-beta y gamma (Figura 1); se obtuvo una banda de precipitación en la inmunoelectroforesis contra suero anti-fibrina y no se encontraron arcos de precipitación al realizar la inmunoelectroforesis con suero anti-proteínas séricas humanas totales. La concentración promedio del fibrinógeno fue de 164.63 mg%, la coagulabilidad promedio de 89%, el tiempo de trombina promedio de 23.55 seg. y los tiempos de protrombina y parcial de tromboplasmina fueron incommensurables. La generación de 5-HMF por miligramo de fibrinógeno fue 60% más alta en los diabéticos que en los sujetos normales (Tabla 2).

En la cromatografía de intercambio iónico, se obtuvo sólo un pico de absorbancia máxima a 280 nm en los tres sujetos normales y la generación de 5-HMF por las fracciones obtenidas del pico de absorbancia máxima mostró un cociente de densidad óptica (d.o.) 443/d.o. 280 de 0.144 (Tabla 3). En dos pacientes diabéticos durante cetoacidosis, se obtuvieron 2 picos de absorbancia máxima en el cromatograma (Figura 2);

la proteína obtenida en las fracciones de ambos picos, concentrada 10 veces mostró una banda de precipitación con suero anti-fibrina durante la inmunolectroforesis. La generación de 5-HMF por estos dos picos, llamados ALFA y BETA de acuerdo a la figura 1, fue diferente: El pico ALFA mostró un valor d.o. 443/d.o. 280 de 0.141, en tanto que el pico BETA mostró un valor de 0.602. En un paciente diabético bien controlado, sólo se obtuvo un poco en el cromatograma, pero éste mostró un descenso lento y tardío de la absorbancia a 280 nm; la generación de 5-HMF por este pico fue similar a la de los picos ALFA tanto de los sujetos diabéticos como de los sujetos normales, con excepción de las 4 últimas fracciones que mostraron un valor de d.o. 443/d.o. 280 de 1.09; a estas fracciones reunidas se les llamó fracción BETA.

DISCUSION

Se han encontrado niveles anormalmente elevados de fibrinógeno en pacientes diabéticos, que conducen a tiempo de -- trombina anormalmente acortados (7). La relación fibrinógeno antigénico/fibrinógeno coagulable es de 1.22 para sujetos normales y de 1.17 para sujetos diabéticos (13) y la vida media del fibrinógeno es más corta en diabéticos hiperglucémicos que en sujetos normales (16); estas observaciones sugieren que el fibrinógeno del diabético puede de alguna manera ser funcionalmente distinto de aquel de los sujetos normales. Los niveles elevados de fibrinógeno en pacientes diabéticos son proporcio-

nales a los niveles de glucemia (7) y de hemoglobina glucosada (13); esta información sugiere que las propiedades coagulables del fibrinógeno pueden estar de alguna manera relacionadas a la hiperglucemia en los pacientes diabéticos.

Los hallazgos de este trabajo sugieren que el fibrinógeno de los pacientes diabéticos está glucosado: 1) La generación de 5-HMF, que es un producto de la cantidad de residuos de hexosa unidos a través de la unión ceto-amina a las proteínas, es 60% más alta en pacientes diabéticos que en sujetos normales; 2) El análisis cromatográfico en carboxi-metil-celulosa del fibrinógeno normal muestra sólo un pico de proteína obtenido a un gradiente de molaridad de acetato de sodio 0.10-0.15 M (Figura 1), mientras que el fibrinógeno de los diabéticos muestra dos picos: Uno (alfa) idéntico al pico del fibrinógeno normal y otro (beta) obtenido a una molaridad de 0.27-0.50; 3) La generación del cromógeno 5-HMF de los picos aislados muestra un incremento 4 veces mayor en el contenido de uniones glucosa-proteína en el pico beta cuando se compara con los picos alfa tanto de los diabéticos como de los sujetos normales, que muestran generaciones similares de 5-HMF.

Dado que la vida media del fibrinógeno es corta y su recambio metabólico es rápido, puede esperarse que sólo los episodios hiperglucémicos recientes podrían causar niveles elevados de fibrinógeno glucosado en sujetos diabéticos. Esta suposición encuentra apoyo en los resultados, ya que sólo durante episodios de cetoacidosis pudieron encontrarse cantidades -

muy elevadas de fibrinógeno glucosado, ituest: En los pacientes cetoacidóticos los picos beta formaron el 42.2 y 23.3% de total de la proteína, en tanto que el paciente diabético bien controlado, cuyas cifras de glucemia previas al examen habían sido de 150 mg% en las 96 horas previas, la fracción conteniendo al fibrinógeno glucosado (beta) fue sólo el 0.017%. Además, esta fracción no pudeo separarse claramente del resto de la proteína, probablemente por que la cantidad de hexosa añadida a la proteína fue insuficiente para modificar sustancialmente su punto isoeléctrico.

El significado funcional de la glucosilación del fibrinógeno de los diabéticos, hasta ahora no descrita, se desconoce; el cambio molecular condicionado por la adición no enzimática de la glucosa podría tener relación con las anomalías funcionales del fibrinógeno de los diabéticos, y con las modificaciones en agregación plaquetaria presentes en pacientes diabéticos.

PARTE IV: ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES
PLAQUETARIAS-FIBRINOGENO DURANTE LA
AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR ADP
EN PACIENTES DIABETICOS Y SUJETOS NORMALES.

El fibrinógeno es capaz de promover la agregación plaquetaria inducida por ADP (22). Las plaquetas humanas aisladas no pueden agregarse cuando se exponen a ADP (23), pero la adición de fibrinógeno a las suspensiones de plaquetas libres

de otras proteínas o componentes plasmáticos permite que las plaquetas se agreguen en presencia de ADP (24). Las plaquetas de pacientes con afibrinogenemia no pueden agregarse adecuadamente con ADP (25) y se ha demostrado que el fibrinógeno induce agregación plaquetaria como resultado de una interacción directa de las plaquetas con el fibrinógeno en presencia de ADP (26).

El fibrinógeno puede modificarse estructuralmente por glucosilación post-sintética tanto IN VIVO (27) como IN VITRO (28); algunas propiedades de la proteína glucosada IN VITRO se han estudiado: La capacidad de precipitar con calor ó de ser coagulado por trombina del fibrinógeno glucosado artificialmente no parece ser distinta de la del fibrinógeno no glucosado (28). Se han encontrado niveles anormalmente elevados de fibrinógeno glucosado en pacientes diabéticos durante descontrolos hiperglucémicos graves (27) y la glucosilación del factor I aparentemente ocurre de manera similar a la de hemoglobina, modificando los extremos amino terminales de las cadenas A alfa y B beta (28).

El presente estudio se realizó con el objeto de estudiar el papel del fibrinógeno de pacientes diabéticos gravemente descontrolados y de sujetos normales durante la agregación plaquetaria inducida por ADP de y de plaquetas purificadas tanto de pacientes diabéticos como de sujetos normales. Esta información podría tener relación parcial con las alteraciones en función plaquetaria que se han descrito en pacientes diabéticos y que han sido motivo de revisiones extensas -

recientes (29).

MATERIAL Y METODOS

Pacientes: Se estudiaron dos pacientes diabéticos insulino-dependientes durante cetoacidosis y dos sujetos normales con glucemia de ayuno normal. Ninguno de los pacientes diabéticos tuvo daño renal, a juzgar por la normalidad de la urea, creatinina y urianálisis ni tenían episodios infecciosos intercurrentes.

Fibrinógeno purificado: Se extrajeron 60 ml. de sangre total de cada sujeto y se colectaron en tubos de plástico conteniendo 0.02 ml. de citrato de sodio al 1% por ml. de sangre total. Las muestras se centrifugaron a 4°C, 1800 G durante 60 min. y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se colectó en tubos de plástico de 40 ml. El fibrinógeno se purificó de acuerdo al método de Silberstein y cols. (17) mediante precipitaciones seriadas con glicina y la pureza de la proteína se evaluó con la misma metodología que la descrita previamente en la parte III (26). El fibrinógeno purificado se suspendió en citrato de sodio 0.055 M pH 7.4 (17) y se dializó extensamente contra amortiguador de Tangen (30). Los ajustes en las concentraciones y diluciones del fibrinógeno se hicieron con amortiguador de Tangen (30); las concentraciones finales de fibrinógeno y su coagulabilidad se midieron por los métodos de Clauss (19) y Atencio y cols. (31) respectivamente.

Filtración en gel de las plaquetas: Las plaquetas se

purificaron mediante filtración en gel; se hicieron algunos cambios mínimos al método descrito por Tangen y cols. (30): Se siliconizaron columnas de vidrio de 15 cm. de longitud con área seccional de 5.3 cm² antes de empacarlas con Sepharosa 2B. El amortiguador original de Tangen (30) se modificó adicionando albúmina humana pura (5 mg/ml) para aumentar la estabilidad de las plaquetas después de la filtración de acuerdo a la información de Tomikawa y cols. (25). Se depositaron 20 ml. de plasma rico en plaquetas (PRP) en la parte superior de la columna y se filtraon haciendo fluir amortiguador de Tangen-albúmina a una velocidad de 175 ml/hora; se colectaron fracciones de 3 ml. en tubos de vidrio siliconizados. Las plaquetas se contaron de acuerdo a Kristenson (32) y se reunieron 21 ml. de plaquetas filtradas por gel (PFG) mezclando las 7 fracciones obtenidas de la columna con el mayor número de plaquetas.

Medición de la agregabilidad de las plaquetas filtradas por gel: las PFG suspendidas en amortiguador de Tangen-albúmina en cantidades de 1.0 a 2.0 x 10⁸/ml. se diluyeron de la siguiente manera: 0.9 ml. de PFG con 0.1 ml. de amortiguador de salina-fosfato (ASF) y 0.4 ml. de PPP. La agregabilidad de esta mezcla se comparó con 0.4 ml. de PRP con 0.9 ml. de amortiguador de Tangen-albúmina de 0.1 ml. de (ASF) de acuerdo a la información en 29. La agregación plaquetaria se midió en un agregómetro Bio-Data modelo PAP-2A usando 50 ul. de ADP 5 x 10⁻⁴M. Al valor de agregación de la mezcla que contenía el PRP se adjudicó un valor de 100%.

Interacción de las PFG con el fibrinógeno purificado durante la agregación plaquetaria inducida por ADP: El fibrinógeno de los diabéticos y sujetos normales se diluyó para obtener concentraciones entre 12 y 0.3 mg%.

En las mezclas agregantes, el fibrinógeno suspendido en amortiguador de Tangen-albúmina se diluyó 12 veces de la siguiente manera: 0.4 ml. de PFG con 0.1 ml. de AFS, 0.05 ml. de amortiguador de Tangen-albúmina y 0.05 ml. de fibrinógeno a diversas concentraciones. Las concentraciones absolutas finales de fibrinógeno aparecen en la tabla 4. La agregación plaquetaria se indujo con 50 ul. de ADP $5 \times 10^{-4}M$ después de incubación por 2 minutos a 37°C. El valor de agregación plaquetaria de la mezcla que contenía las plaquetas y el fibrinógeno de los pacientes diabéticos se usó como el 100%. Se usaron cinco diluciones de fibrinógeno para cada una de las mezclas agregantes y se hicieron mezclas con los fibrinógenos y las plaquetas tanto de los sujetos diabéticos como de los sujetos normales.

RESULTADOS

Una vez suspendido en amortiguador de Tangen-albúmina (30), el fibrinógeno tanto de los sujetos diabéticos como de los sujetos normales mostró la misma pureza que aquel usado en el trabajo previo (27). Las concentraciones promedio finales del fibrinógeno antes de hacer las diluciones fueron de 205 y 187.5 mg% respectivamente en los sujetos diabéticos y normales respectivamente, con una coagulabilidad promedio de 90 y 86% -

también respectivamente.

Como aparece en la figura 3, las plaquetas pudieron separarse claramente de las proteínas plaquetarias: Los cromatogramas de absorbancia a 280 nm. muestran que las fracciones 7 a 13 contenían plaquetas que, cuando se mezclaron, dieron un número de 1.16 y $1.33 \times 10^8/\text{ml}$. en promedio para sujetos diabéticos y normales respectivamente. Las plaquetas en estas condiciones, al filtrarse nuevamente a través de la columna de Sepharosa, mostraron un sólo pico de absorbancia máxima.

Al comparar la agregabilidad de las mezclas que contienen el PRF (1000%) con la de las PFG, encontramos que la agregabilidad promedio fue de 98 y 94% respectivamente para pacientes diabéticos y sujetos normales.

Los valores de la agregación plaquetaria manteniendo "plaquetas" como covariable mostraron que las plaquetas de los diabéticos fueron menos agregables con el fibrinógeno de los diabéticos que con el fibrinógeno normal ($p < .001$). El mismo efecto se observó en las plaquetas normales ($p < .05$) (Tabla 4).

Los valores de la agregación plaquetaria manteniendo fibrinógeno del diabético como el del sujeto normal ($p < .001$) (Tabla 4).

DISCUSION

Las anormalidades de la función plaquetaria de pacien

tes diabéticos son numerosas y han sido motivo de revisiones recientes (1); el consenso general es que las plaquetas de los diabéticos son más agregables que las de sujetos no diabéticos y que la hiperagregabilidad plaquetaria es multi-factorial (29). Los cofactores plasmáticos de la agregación plaquetaria como el fibrinógeno y fracción Von-Willebrand del factor VIII, se han encontrado elevados en pacientes diabéticos (13); las concentraciones anormalmente elevadas de fibrinógeno en diabetes mellitus han sido reportadas como directamente proporcionales a los niveles de glucosa (7) y de hemoglobina glucosadas (13).

La glucosilación post-sintética de numerosos péptidos ha sido descrita en diabéticos (4); este cambio en la estructura molecular de las proteínas se ha relacionado con cambios funcionales, como la modificación en carga eléctrica y en la posición de la curva de disociación hemoglobina/oxígeno de la hemoglobina glucosada (8). Hasta ahora, las propiedades de coagulabilidad del fibrinógeno glucosado IN VITRO parecen ser similares a aquellas del fibrinógeno glucosado (28), pero no se ha estudiado el papel del fibrinógeno glucosado en la agregación plaquetaria, considerando a esta proteína como un cofactor necesario para lograr la completa agregación de las plaquetas.

La glucosilación de las proteínas es inhibida IN VITRO con ácido acetil-salicílico (AAS) (21); el efecto promotor de agregación plaquetaria del fibrinógeno es inhibido por AAS tan

to IN VIVO como IN VITRO (33). La glucosilación del fibrinógeno, al menos IN VITRO, ocurre en las cadenas A-alfa y B-beta (28); el extremo amino terminal de la última es apto para ser glucosilado y a su vez, imprescindible para el efecto -- promotor de agregación plaquetaria del fibrinógeno (34).

En los ensayos que hemos hecho en este trabajo, hubiese sido deseable utilizar el fibrinógeno glucosado aislado, - que puede separarse del fibrinógeno no glucosado dadas las diferencias en punto isoeléctrico (27); sin embargo, el proceso para lograr la separación de estos iso-péptidos ocurre a pH4.65, condición que daña irreversiblemente al fibrinógeno en su capacidad de coagularse por trombina y de agregación plaquetaria en presencia de ADP (35). Por esta razón, decidimos usar el fibrinógeno completo de los pacientes deabéticos, asumiendo que, dado que se encontraban en cetoacidosis, la cantidad de iso-péptido glucosado era alta, como previamente los habíamos demostrado (27).

Los resultados encontrados sugieren que el fibrinógeno es necesario para la agregación plaquetaria inducida por ADP tanto de las plaquetas de sujetos normales como de pacientes diabéticos; que el fibrinógeno de diabéticos y sujetos -- normales es capaz de actuar como cofactor de la agregación -- plaquetaria inducida por ADP y que el efecto promotor de agregación plaquetaria del fibrinógeno es distinto en sujetos diabéticos que en sujetos normales, ya que el fibrinógeno de los diabéticos promovió menos agregación plaquetaria que aquel de sujetos normales ($p < .05$). Por otro lado, los resultados su--

gieren que las plaquetas de los sujetos diabéticos son más agregables que las de sujetos normales en presencia de ambos tipos de fibrinógeno, cuando la agregación plaquetaria se induce con ADP ($p < .001$).

La causa por la que el fibrinógeno de los diabéticos es menos apto para promover agregación plaquetaria en presencia de ADP no se conoce; puede especularse que, la alteración del extremo amino de la cadena B-beta del fibrinógeno por glucosilación podría disminuir la capacidad promotora de agregación por ADP del fibrinógeno, que depende de esta parte de la molécula. Este efecto ha sido demostrado con AAS y es notable que la acetilación y glucosilación proteicas son fenómenos similares y -- competitivos (21). Otras explicaciones sin embargo se antojan plausibles: La vida media del fibrinógeno y el recambio metabólico se han encontrado acortados y acelerados respectivamente - en pacientes diabéticos durante hiperglucemia grave (16); por - esta razón, es posible que la producción de productos de frag- - mentación del fibrinógeno IN VITRO se encuentre también acelera - da y que la hipo-agregabilidad plaquetaria observada dependa de la presencia de los fragmentos del fibrinógeno que se sabe son capaces de disminuir la agregación plaquetaria (36).

La hiperagregabilidad plaquetaria de los diabéticos, -- ampliamente estudiada y aparentemente multifactorial (29) no es el objetivo de esta discusión. Nuestros resultados sugieren -- que la hiperagregabilidad plaquetaria de los diabéticos no de- - pende de la glucosilación post-disnetética de la molécula del -

fibrinógeno.

Se concluye que el fibrinógeno de pacientes diabéticos durante hiperglucemia grave tiene una capacidad promotora de - agregación plaquetaria inducida por ADP menor que el de los su jetos normales y que las plaquetas de los diabéticos son más - aptas para agregarse en presencia de ADP y fibrinógeno que las plaquetas de los sujetos normales.

PARTE V: ESTUDIO DE LA GLUCOSILACION DE:
LAS PROTEINAS PLAQUETARIAS EN PACIENTES
DIABETICOS Y SUJETOS NORMALES.

De acuerdo a diversas publicaciones, ha podido conocerse que la hiperagregabilidad plaquetaria de los diabéticos es - un fenómeno multifactorial y probablemente relacionado con el desarrollo del daño micro y macrovascular de estos enfermos (29). El estudio de la glucosilación proteica en enfermos diabéticos ha logrado algunos avances en el conocimiento de algunas de las causas de la aparición de las complicaciones tardías propias de la enfermedad (4). Los péptidos que se han descrito como capaces de sufrir glucosilación post-sintética son varios: Hemoglobina A (8), hemoglobina A2 (37), fibrinógeno (26, 27), proteínas de la membrana del eritrocito (38), albúmina (21), colágena (39), proteínas del lente del cristalino (40), proteínas básicas de la mielina de los nervios (41), insulina (10), etc. En algunos casos, esta modificación de la estructura proteica conduce a cam--

bios en la funcionalidad de la misma (4)

Hemos demostrado con anterioridad que la glucosilación del fibrinógeno no parece jugar un papel importante en la hiperagregabilidad plaquetaria de los diabéticos durante la agregación inducida por ADP (41); el efecto hiperagregante en estos estudios parece depender más de alteraciones inherentes a las plaquetas que de alteraciones en el cofactor de la agregación estudiado.

Basados en estas ideas, realizamos un estudio para investigar si las proteínas intraplaquetarias de los diabéticos eran capaces de ser glucosiladas.

MATERIAL Y METODOS

Se purificaron plaquetas de 2 pacientes diabéticos durante cetoacidosis y 2 sujetos normales mediante el método de filtración en gel descrito con detalle con anterioridad (30); se obtuvieron concentraciones plaquetarias de 2.06 y 1.96×10^8 /ml. para los sujetos normales y diabéticos respectivamente. Los concentrados plaquetarios fueron congelados en nitrógeno líquido y descongelados 5 veces, posteriormente se centrifugaron 30 min. a 1800 G a temperatura ambiente y se filtraron a través de filtros de millipore de 45 y 22 μ m. subsecuentemente. Las proteínas así obtenidas se concentraron 10 veces mediante diálisis contra Fycoll (R) y se determinó en ellas la cantidad de 5-HMF generado por mg. de proteína de acuerdo con 20. La generación de 5-HMF se expresó por el cociente densidad óptica (d.o.) 443/mg.

de protefna.

RESULTADOS

Las plaquetas obtenidas por filtración al filtrarse nuevamente por la columna de Sepharosa 2B produjeron sólo un pico de absorbancia máxima a 280 nm; la generación del cromógeno producto del número de uniones hexosa-protefna a través de la unión cetoamina (5-HMF) aparece en la tabla 5; fue 87% más alta en los diabéticos que en los sujetos normales.

DISCUSION

Los resultados sugieren que las protefnas plaquetarias de los diabéticos durante cetoacidosis se encuentran más glucosadas que aquellas de los sujetos normales. El fibrinógeno es una de las protefnas capaces de glucosilarse que se encuentran en el interior de las plaquetas y es probable que el incremento de protefnas intraplaquetarias glucosadas observado dependa al menos parcialmente de la glucosilación del fibrinógeno (27, 28). Es posible sin embargo que otros péptidos intraplaquetarios sean capaces también de glucosilarse. El significado funcional de la glucosilación de las protefnas intraplaquetarias y su probable relación con la hiperagregabilidad plaquetaria de los diabéticos se desconoce.

COMENTARIO

Esta serie de trabajos apoyan la importancia del estudio

detallado de algunas de las alteraciones hematológicas en diabetes mellitus. El estado "hipercoagulable" que numerosos investigadores han encontrado en pacientes diabéticos parece obedecer a numerosas alteraciones, algunas de las cuales podrían tener relación con la glucosilación proteica estudiada cada vez con mayor detalle en pacientes diabéticos.

El significado funcional de la glucosilación post-sintética del fibrinógeno y de las proteínas plaquetarias, observaciones probablemente más trascendentes de esta serie de estudios, en el momento actual se desconoce con detalle, pero es posible que de alguna manera tengan relación con el daño microvascular de los pacientes diabéticos. Resulta prudente citar en este momento que la inyección de proteínas plasmáticas glucosiladas IN VITRO es capaz de producir en animales de experimentación cambios histológicos y funcionales en el glomérulo indistinguibles de aquellos observados en nefropatía diabética (42). También debe señalarse que la glucosilación proteica puede abolirse IN VITRO con salicilatos (21). El entendimiento de la trascendencia de la glucosilación proteica en diabetes mellitus y su posible manipulación terapéutica podría en algún momento tener traducción en el beneficio de los enfermos diabéticos. En este momento ese objetivo parece lejano, pero sólo podremos acercarnos a él tratando de estudiar con más detalle estos y tantos otros puntos oscuros pero atractivos de la medicina.



2

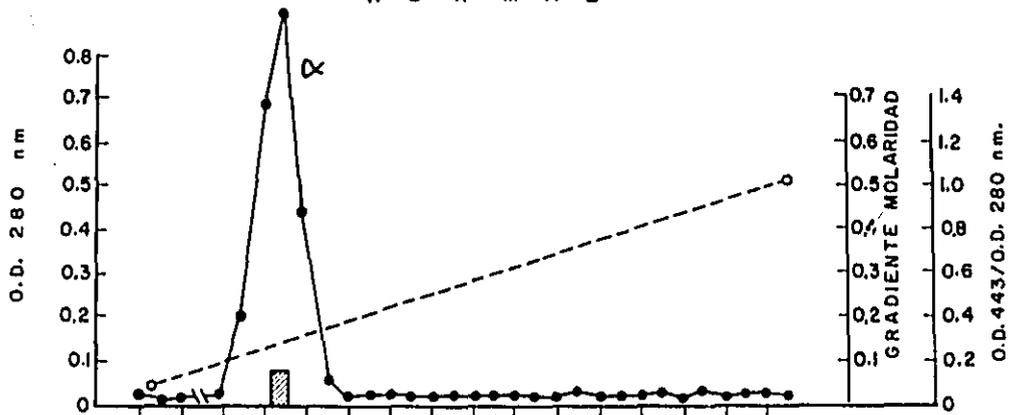
B

8

Figura 1.

Cromatograma en gel de poliacrilamida usando dodecil-sulfato de sodio pH 6-8 del fibrinógeno purificado de un paciente diabético. Nótese las bandas correspondientes a las cadena A-alfa (α), B-beta (β) y gamma (γ).

N O R M A L



D I A B E T I C O

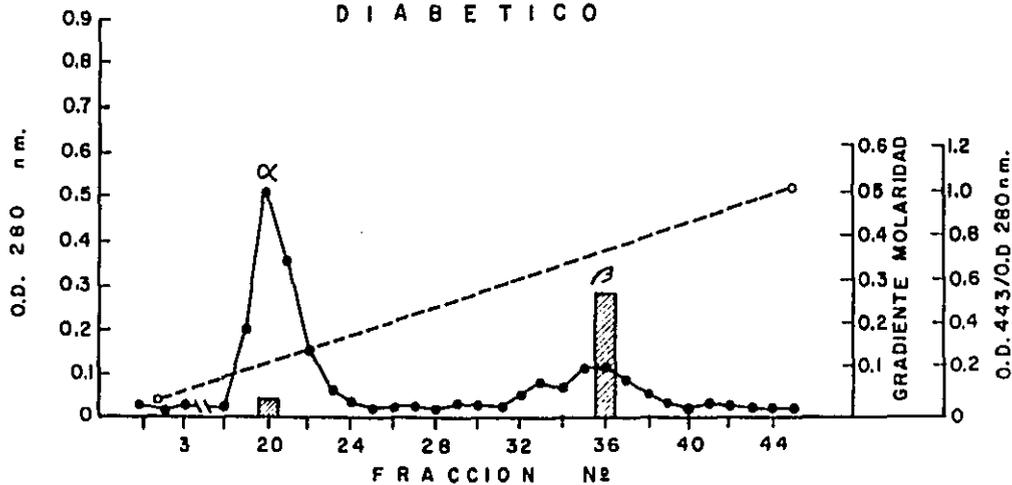


Figura 2.

Cromatograma en carboxi-metil-celulosa del fibrinógeno purificado de un sujeto diabético y un sujeto normal. Las muestras de la proteína en acetato de sodio 0.01M pH 4.65 se depositaron en la columna (25 x 19 cm., fracciones de 3 ml.) de la resina. El gradiente de molaridad se ha graficado en líneas discontinuas, la densidad óptica a 280 nm. en líneas continuas y la generación de 5 hidroximetil-furfural por unidad de proteína (d.o. 443/d.o. 280) en barras verticales. Los picos de absorbancia máxima a 280 nm. fueron designados arbitrariamente alfa (α) y beta (β).

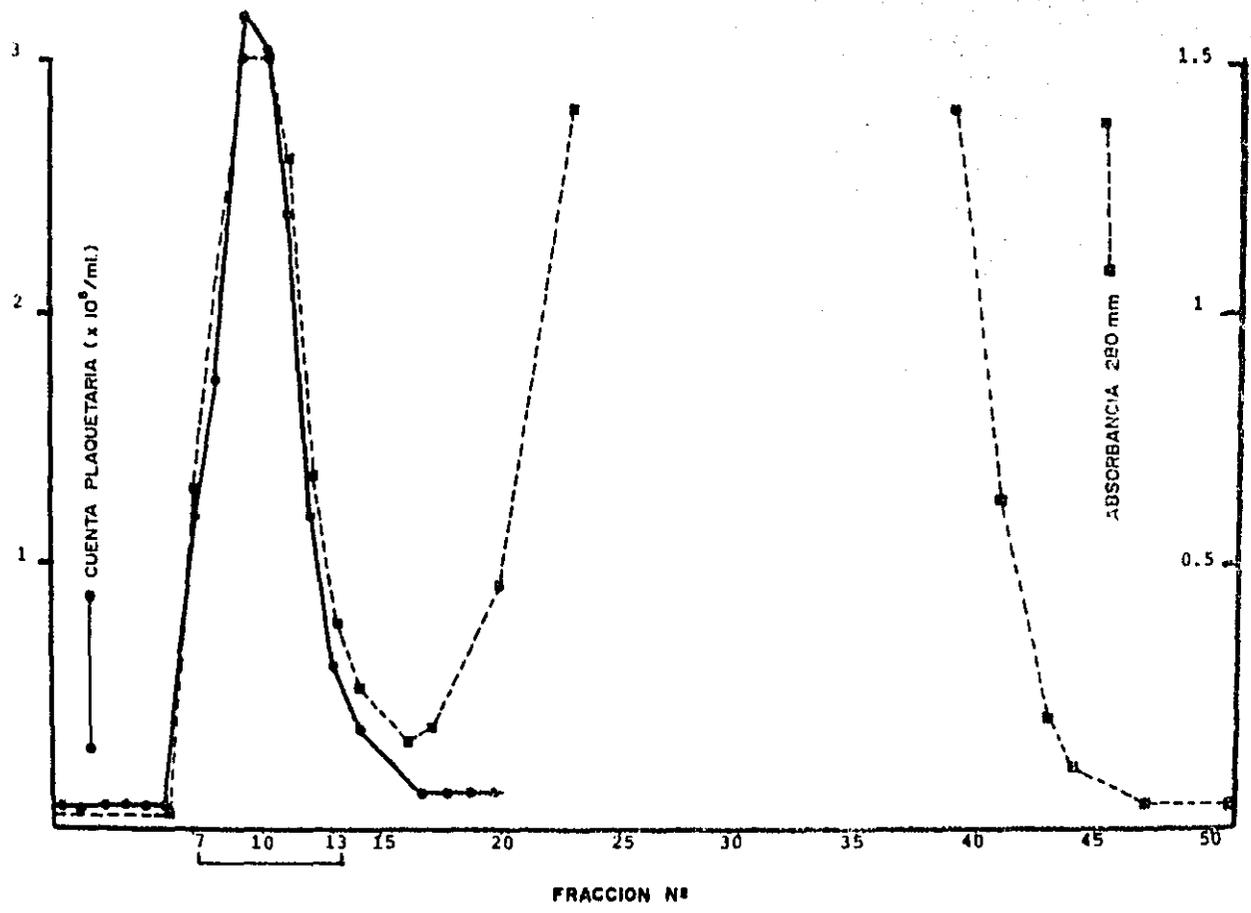


Figura 3.

Cromatograma de 20 ml. de plasma rico en plaquetas filtrado a través de Sepharosa 2-B. Se colectaron fracciones de 3 ml. en tubos de vidrio siliconizados y se midieron a 280 nm. (línea discontinua). Las cuentas plaquetarias de acuerdo a Kristenson (32) se han graficado en línea continua).

	DIABETES TIPO II	DIABETES TIPO I	SUJETOS NORMALES
NUMEROS DE CASOS	22	20	22
SEXO: MASC/FEM	14/8	10/10	9/13
* EDAD EN AÑOS	56.45 - 11.67	28.05 - 9.20	27.27 - 8.85
* EVOLUCION EN AÑOS	12.98 - 8.49	9.23 - 7.06	-
* GLUCEMIA (mg/dl)	148.68 - 71.91	239.70 - 114.71	74.16 - 12.07
* FIBRINOGENO (mg/dl)	751.82 - 327.07	621.25 - 338.94	385.00 - 105.02
* T.T. (seg.)	18.65 - 0.57	18.81 - 0.60	18.97 - 0.52
* T.A.P. (min)	5.59 - 1.51	5.64 - 1.74	5.76 - 2.60
* R.A.P. (%)	7.54 - 8.32	3.51 - 4.86	8.45 - 5.74
* A.A. (%)	4.09 - 5.73	5.00 - 16.56	1.36 - 1.98
* HbA1c (%)	10.71 - 2.58	15.71 - 3.55	7.12 - 1.10

TABLA 1. Datos clínicos y valores de glucemia, fibrinógeno tiempo de trombina (T.T.), tiempo total de agregación plaquetaria (T.A.P.) tiempo de retardo de aparición de la segunda fase de agregación plaquetaria (R.A.P) autoagregación plaquetaria (A.A.) y hemoglobina glucosada (HbA1c) en los tres grupos estudiados. (*) promedio y desviación estándar. (Publicado en 7).

mg. fib.	d.o. 443	d.o. 443/mg. fib.	mg. fib.	d.o. 443	d.o. 443/mg. fib.
.170	.086	.505	.200	.153	.765
.340	.157	.462	.400	.249	.622
.510	.170	.333	.600	.484	.806
.680	.246	.361	.800	.623	.778
.850	.428	.503	1.000	.691	.691
1.700	.631	.371	2.000	.834	.417
NORMAL		PROMEDIO .423	DIABETICO		PROMEDIO .679

$$\text{DIABETICO/NORMAL} = .679/.423 = 1.605$$

Tabla 2. Valores de generación de 5 hidroximetilfurfural, medidos a 443 nm (d.o. 443) por miligramo de fibrinógeno (mg. fib.) en un paciente diabético y un sujeto normal.

MUESTRA	d.o. 443	d.o. 280	d.o. 443/d.o. 280	
PICO ALFA NL 1	0.063	2.425	0.026	
PICO ALFA NL 2	0.556	3.273	0.170	PROMEDIO 0.144
PICO ALFA NL 3	0.373	1.580	0.236	
PICO ALFA DM 1	0.105	1.355	0.070	
PICO ALFA DM 2	0.397	1.400	0.283	PROMEDIO 0.141
PICO ALFA DM 3	0.675	9.350	0.072	
PICO BETA DM 1	0.308	0.989	0.310	
PICO BETA DM 2	0.380	0.425	0.894	PROMEDIO 0.602
FRAC BETA DM 3	0.178	0.162	1.090	

Tabla 3. Valores de generación de 5 hidroximetil-furfural por unidad de proteína (d.o. 443/d.o. 280) de los picos de absorbancia máxima obtenidos de las columnas de cromatografía de los sujetos normales (NL), de los pacientes diabéticos (DM) y de la fracción beta de los pacientes diabéticos (FRAC BETA DM 3).

ESTA TESIS NO DEBE
 SAIR DE LA BIBLIOTECA

<u>PLAQUETAS</u> <u>FIBRINOGENO</u>	DIABETICAS		NORMALES	
	NORMAL	DIABETICO	NORMAL	DIABETICO
1.000	100	100(+)	66	60
0.500	72	70	33	30
0.100	48	48	24	24
0.075	42	33	6	6
0.050	42	31	0	0
0.025	30	31	0	0
mg † (++)	† Agr.	† Agr.	† Agr.	† Agr.

Tabla 4. Valores porcentuales de agregación plaquetaria († Agr.) de sujetos normales y pacientes diabéticos durante cetoacidosis, con respecto al valor de la agregación plaquetaria observado con las plaquetas y el fibrinógeno de los pacientes diabéticos (+). Las cantidades de fibrinógeno (++) expresadas en mg†. se refieren a la concentración absoluta final una vez hecha la mezcla agregante (ver texto).

PACIENTES	Mg. PROTEINA PLAQUETARIA	D.o. 433	d.o. 443/mg. PROTEINA
	1.666	.037	.022
	0.833	.030	.036
NORMALES	0.416	.024	.057
	0.277	.017	.063 PROMEDIO .047
	0.208	.012	.060
	1.2133	.055	.045
	0.606	.037	.061
DIABETICOS	0.303	.035	.115 PROMEDIO .088
	0.202	.025	.123
	0.151	.015	.098
	.088/.047 = 1.87		

Tabla 5. Generación de 5 hidroximetilfurfural medio a 443 nm (d.o. 443) por mg. de proteína (d.o. 443/mg. proteína) plaquetaria derivada de sujetos normales y pacientes diabéticos en cetoacidosis.

REFERENCIAS

- 1.- Jones, R.L.; Peterson, C.M.: Hematologic Alterations in Diabetes Mellitus. *Am. J. Med.* 70:339-352, 1981.
- 2.- Virchow, R.: Cellular pathology. London: John Churchill. 1960.
- 3.- Joslin, E.P.: A diabetic manual. 7th. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1941.
- 4.- Bunn, H.F: Nonenzymatic glycosilation of protein: Relevance to diabetes. *Am. J. Med.* 70:325-330, 1981.
- 5.- Trivelli, L.A.; Ranney, H.M.; Lai, H.T.: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 284:353, 1971.
- 6.- Ruíz-Argüelles, G.J; Padrós-Semorile, M.R.; Alvarez-Hernández, X.; González-Arocha, Y.: Determinación rápida de los niveles de hemoglobina glucosada mediante microcromatografía en resina de intercambio iónico. *Rev. Mex. Pat. Clin.* 30:47-52, 1980.
- 7.- Ruíz-Argüelles, G.J.; Lanzetti-de-Peschard, C.; Padrós-Semorile, M.R.; Calles-Escandón, J.; Córdova, M.S.: Alteraciones Hemostáticas en Diabetes Mellitus idiopática. *Rev. Invest. Clin. (Méx)* 33:355-359, 1981.

- 8.- Mc Donald, J.M.; Davis, J.E.: Glycosylated haemoglobins and diabetes mellitus. *Human Pathol* 10:279-291, 1979.
- 9.- Schnider, S.L.; Kohn, R.R.: Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 66:1179-1181, 1980.
- 10.- Dolhofer, R.; Wieland, O.H.: Preparation and biological properties of glycosylated insulin. *FEBS Lett* 100:133-136, 1979.
- 11.- Guthrow, C.E.; Morris, M.A.; Day, J.F.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W.: Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4258-4261, 1979.
- 12.- Day, J.F.; Ingebretsen, C.G.; Ingebretsen, W.R.; Baynes, J.W.; Thorpe, S.R.: Nonenzymatic glucosylation of serum protein and hemoglobin: Response to changes in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes* 29:524-527, 1980.
- 13.- Collier, B.S.; Frank, R.N.; Milton R.C.; Gralnick, H.R.: Plasma cofactors of platelet aggregation: Correlation with diabetic retinopathy and hemoglobins A 1a-c. *Ann. Intern. Med.* 88:311-316, 1978.
- 14.- Egeberg, O: The blood coagulability in diabetic patients. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15:533-538, 1963.

- 15.- Bannerjee, R.N.; Kumar, V.; Sahu, A.L.: Plasma thrombin clotting time and plasma fibrinogen in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Indian J. Med. Res.* 60:1432, 1972.
- 16.- Jones, R.L.; Peterson, C.M.: Reduced fibrinogen survival in diabetes mellitus: A reversible phenomenon. *J. Clin. Invest.* 63:485, 1979.
- 17.- Silberstein, E.B.; Ingraham, S.C.; Kerelakes, J.G.: The determination of optimum glycine concentration for the preparation of human fibrinogen at ambient temperatures. *Thrombos Diathes haemorrh (Sttug)* 29:572-578, 1973.
- 18.- Morrison, P.R.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XV. Some factors influencing the quantitative determination of fibrinogen. *J. Am. Chem. Soc.* 69:2723-2728, 1947.
- 19.- Clauss, A.: Gerinnungs physiologische schnellmethode zur bestimmun des fibrinogens. *Acta Haematol.* 17:237, 1957.
- 20.- Fluckiger, R.; W interhalter, K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin A 1c. *FEBS Lett* 71:356-360, 1976.
- 21.- Day, J.F.; Thornburg, R.W.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W.: Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. *J. Biol. Chem.* 254:9394-9400, 1979.

- 22.- Solum, N.O.; Stormorken, H.: Influence of fibrinogen on the aggregation of washed human blood platelets induced by adenosine diphosphate, thrombin, collagen and adrenaline. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17 (Suppl, 84): 170-182, 1965.
- 23.- Mustard, J.F.; Packham, M.A.; Kinlough-Rathbone, R.L.; Perry, D.W.; Regoeczi, E.: Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. Blood 52:453-466, 1978.
- 24.- Deykin, D.; Pritzker, C.R.; Scolnick, E.M.: Plasma co-factors in adenosine diphosphate-induced aggregation of human platelets. Nature 208-296-298, 1965.
- 25.- Gugler, E.; Luscher, E.F.: Platelet function in congenital afibrinogenemia. Thromb Diath Haemorrhag. 14:361-373, 1965.
- 26.- Tomikawa, M.; Iwamoto, M.; Soderman, S.; Blomback, B.: Effect of fibrinogen on ADP-induced platelet aggregation. Thromb. Res. 19:841-855, 1980.
- 27.- Calles-Escandón, J.; Rufiz-Arguelles, G.J.; Padrós-Semorile, M.R.; Lanzetti-de-Peschard, C.; Córdova, M.S.; Lozano, O.: Fibrinogen glycosylation in human diabetes mellitus. Blood 58:213a, 1981 (abstr.).
- 28.- Mc Verry, B.A.; Thorpe, S.; Joe, F.; Gaffney, P.J.; Huehns, E.R.: In Vitro glycosylation of fibrinogen. (abstr.) Br. J. Haematol. 45:174, 1980.

- 29.- Colwell, J.A.; Halushka, P.V.: Platelet function in diabetes mellitus. *Br. J. Haematol.* 44:521-526, 1980.
- 30.- Tangen, O.; Berman, H.J.; Marfey, P.: Gel filtration. A new technique for separation of blood platelets from plasma. *Thromb Diath. Haemorrhag.* 25:268-278, 1971.
- 31.- Atencio, A.C.; Burdick, D.C.; Reeve, E.B.: An accurate isotope dilution method for measuring plasma fibrinogen. *J. Lab. Clin. Med.* 66:137, 1965.
- 32.- Kristenson, A.A.: A new method for the direct counting of the so-called blood platelets in man. *Acta Med. Scand.* 57:301-312, 1922.
- 33.- Okonkwo, P.; Sise, H.S.: Effect of aspirin in vivo and in vitro on plasma cofactors of platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 25:268-278, 1971.
- 34.- Niewiarowski, S.; Budzynski, A.Z., Lipinski, B.: Significance of the intact polypeptide chains of human fibrinogen in ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 49:635-644, 1977.
- 35.- Ruiz-Arguelles, G.J.: Observación personal.
- 36.- Kowalski, E.; Kopec, M.; Wegrzynowcz, S.: Influence of fibrinogen degradation products (FDP) on platelet aggregation, adhesiveness and viscous metamorphosis. *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 10:406, 1964.

- 37.- Tegos, C.; Beutler, E.: Glycosylated Hemoglobin A2 Components. *Blood* 56:571-572, 1980.
- 38.- Miller, J.A.; Gravallesse, E.; Bunn, H.F.: Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins: relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* 65:896-901, 1980.
- 39.- Schnider, S.L.; Kohn, R.R.: Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 66:1179-1181, 1980.
- 40.- Stevens, V.J.; Rouzer, C.A.; Monnier, V.M.; Cerami, A.: Diabetic cataract formation: Potential role of glucosylation on lens crysallins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2918, 1978.
- 41.- Fluckiger, R.; Winterhalter, K.H.: Glycosylated hemoglobins. *En. Labie D, Poyart C, Rosa J (eds.). Molecular interactions of hemoglobin. INSERM* 70:319-326, 1977.
- 42.- McVerry, B.A.; Hopp, A.; Fisher, C.; Huehns, E.R.: Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glycosylated proteins. *Lancet* 1:738, 1980.