

Resumen de la disertación titulada: " Investigación genética de la agregación plaquetaria inducida por adrenalina", presentada por la Dra. Blanca Esther Gaxiola Rodríguez, ante la Facultad de Medicina Teórica de la Universidad Ruperto Carola, de Heidelberg (RFA), para la obtención del grado de Doctor en Medicina.

El trabajo fué realizado en el Instituto de Genética Humana de la citada Universidad, bajo la dirección del Prof. Dr. Friedrich Vogel y el Prof. Dr. Peter Propping en el año de 1964.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Farmacogenética, un término acuñado por Vogel (1959), es el campo de la Genética Humana que estudia los factores genéticos en la respuesta del organismo ante un fármaco dado. La variabilidad genética a nivel enzimático, ha sido hasta ahora investigada ampliamente, tanto en lo que se refiere a valores enzimáticos normales como patológicos. De acuerdo a lo anterior, existe también la posibilidad de una variabilidad genética a nivel de receptores hormonales o para distintos fármacos. Se han descrito, entre otros, defectos a nivel del receptor para lipoproteína de baja densidad (LDL), para testosterona o para insulina. Sin embargo, apenas se ha investigado, dentro de la normalidad la variabilidad genética de los receptores definidos mediante técnicas farmacológicas, por ejemplo el receptor para imipramina o los receptores adrenérgicos.

El desarrollo de técnicas con sustancias marcadas radioactivamente (binding) ha permitido al investigador en Farmacología determinar en diferentes constituyentes de la sangre distintos receptores. Así, se han identificado receptores alfa-adrenérgicos en trombocitos, mismos que se comportan en estudios más específicos como receptores alfa-2-adrenérgicos.

Además de estas técnicas farmacológicas, existe la posibilidad de caracterizar a estos receptores mediante el estudio de eventos biológicos mediados por ellos, por ejemplo, inhibición de la actividad de la adenilciclase o la agregación plaquetaria.

Al actuar sobre los receptores alfa-adrenérgicos, la adrenalina y la noradrenalina producen una agregación plaquetaria que se puede medir en plasma rico en plaquetas (PRP), haciendo uso de la fotometría. La fig. no. 1 muestra una curva típica de éste fenómeno.

El objetivo del presente trabajo fué determinar las posibles diferencias genéticas de los receptores alfa-adrenérgicos de los trombocitos, teniendo

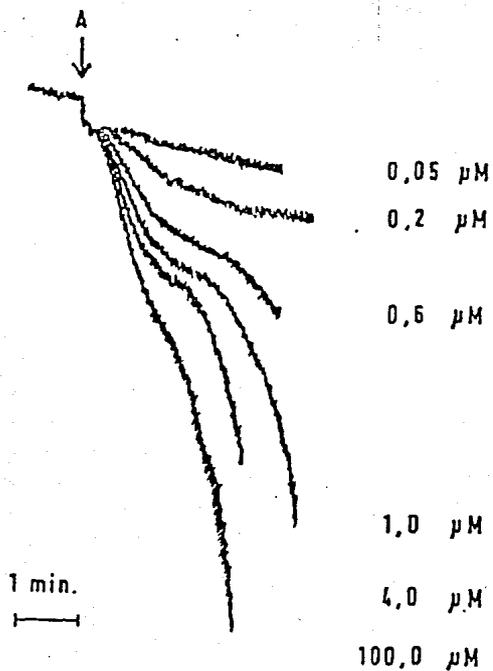


Fig. no. 1. Ejemplo del efecto de distintas concentraciones de adrenalina sobre la agregación plaquetaria.

como parámetro la agregación plaquetaria inducida por adrenalina como función de los mismos, aplicando el método de gemelos.

En una primera fase se determinaron las concentraciones de adrenalina que eran requeridas para producir una agregación plaquetaria que permitiera establecer diferencias interindividuales, así como la concentración de fentolamina necesaria para inhibir ésta agregación. En ésta fase se establecieron también los parámetros para la cuantificación de la agregación.

En una segunda fase se estudió si éste comportamiento era en forma intraindividual, estable.

En una muestra grande de población masculina sana se estudió la variabilidad interindividual de la agregación plaquetaria inducida por adrenalina.

Los mismos estudios se llevaron a cabo en un grupo de gemelos monogóticos y dicigóticos para investigar si ésta función de los receptores alfa-adrenérgicos, la agregación plaquetaria inducida por adrenalina, mostrara similitudes o diferencias que permitieran determinar la presencia de factores genéticos a nivel del receptor.

La revisión de la literatura describe brevemente el muy complejo sistema de la agregación plaquetaria y se ocupa de las diferentes sustancias que pueden desencadenar dicho fenómeno. Aquí se describe más ampliamente la agregación inducida por adrenalina, así como también los factores que pueden influir sobre ella. Por último, se describen los padecimientos tanto genéticos como adquiridos en los que se presenta una agregación plaquetaria alterada.

En el capítulo de material y métodos se describe detalladamente las sustancias químicas, el equipo de laboratorio, el material biológico

así como las características de los sujetos de estudio, los métodos de experimentación, cuantificación e interpretación de los resultados que en forma resumida se presenta a continuación.

Las sustancias químicas utilizadas fueron: bitartrato de l-epinefrina, adenosin-5- difosfato sódico (ADP), A-23187 y colágena.

Los sujetos de estudio fueron 17 parejas de gemelos monocigóticos varones (MC), 15 parejas de gemelos dicigóticos (DC) también varones, cuya cigosidad era ya conocida por estudios previos. Todos estaban sanos y por lo menos dos semanas antes el estudio no habían ingerido ningún tipo de medicamento. Diez estudiantes o miembros del Instituto, también del sexo masculino, sanos y sin ingestión previa de medicamentos sirvieron como control.

Procedimiento: Después de una noche de ayuno de los sujetos de estudio, se tomó en la mañana, temprano, una muestra de sangre venosa que se anticoaguló con citrato de sodio (0.35%, concentración final). El plasma rico en plaquetas (PRP) y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se preparó por centrifugación a 150xg y 1500 xg respectivamente durante 20 minutos.

Las plaquetas fueron contadas en el PRP con ayuda del contador de plaquetas C (Thrombocounter C) y las muestras fueron diluidas con el PPP homólogo a 350 000 plaquetas/ μ l, si era necesario. Dos personas se examinaban el mismo día en el mismo experimento, una pareja de gemelos o dos personas control.

La agregación fué monitoreada a 37 °C en tubos de 250 μ l que contenían una barra magnética, a 1000 rpm en un agregómetro ELVI. Para cada muestra se ajustó la transmisión a 10% con PRP y a 90% con el correspondiente PPP. Los tubos, conteniendo 240 μ l de PRP se incubaron durante 2 minutos, agregandose después, 10 μ l de adrenalina, por lo menos 6 concentraciones distintas y se procedió al registro de las curvas de

agregación. En una segunda serie de experimentos, se agregaron diferentes concentraciones de fentolamina y se indujo agregación con $4 \mu\text{M}$ de adrenalina (concentración final), procediéndose también al registro. En algunos experimentos se indujo agregación, además, con ADP o colágena y con adrenalina en presencia de A-23187.

Como parámetro para la comparación de los valores en un mismo individuo, se determinó la concentración de adrenalina que produjo un efecto de agregación a la mitad de su máximo (fig. no. 2). Igualmente se estableció la concentración de fentolamina, que produjo una inhibición de la agregación plaquetaria inducida por adrenalina correspondiente a la mitad de su máximo (fig. no. 3). Estos valores variaron, en 47 voluntarios independientes de los sujetos de estudio, entre $0.3 - 1.9 \mu\text{M}$ para adrenalina y $0.3 - 1.2 \mu\text{M}$ para fentolamina (fig. 4 y 5). La reproducción de estos valores en determinaciones repetidas en la misma persona ($r = 0.61$) es medianamente grande. De la comparación entre MC ($r = 0.65$) y DC ($r = 0.43$) se deduce que existen factores genéticos que participan en la agregación plaquetaria inducida por adrenalina, aunque en una medida insignificante. En cuanto a la inhibición de la agregación inducida por adrenalina por medio de la fentolamina, la comparación entre MC ($r = 0.42$) y DC ($r = 0.67$) no proporcionó un resultado coherente (tabla no. 1).

Las concentraciones de adrenalina necesarias para producir una agregación a la mitad del máximo, no estuvieron en relación directa al número de receptores alfa-adrenérgicos. Estos últimos se determinaron en las mismas muestras en una investigación paralela, mediante estudios de "binding". De lo anterior se deduce que la agregación inducida por adrenalina, si bien sirve para caracterizar a los receptores alfa-adrenérgicos en plaquetas, no es concluyente en cuanto al número de receptores.

En cuatro voluntarios, entre ellos una pareja de gemelos monocigóticos, se constató una agregación plaquetaria peculiar; a pesar de agregar hasta $100 \mu\text{M}$ de adrenalina, cuando la dosis máxima requerida para producir una

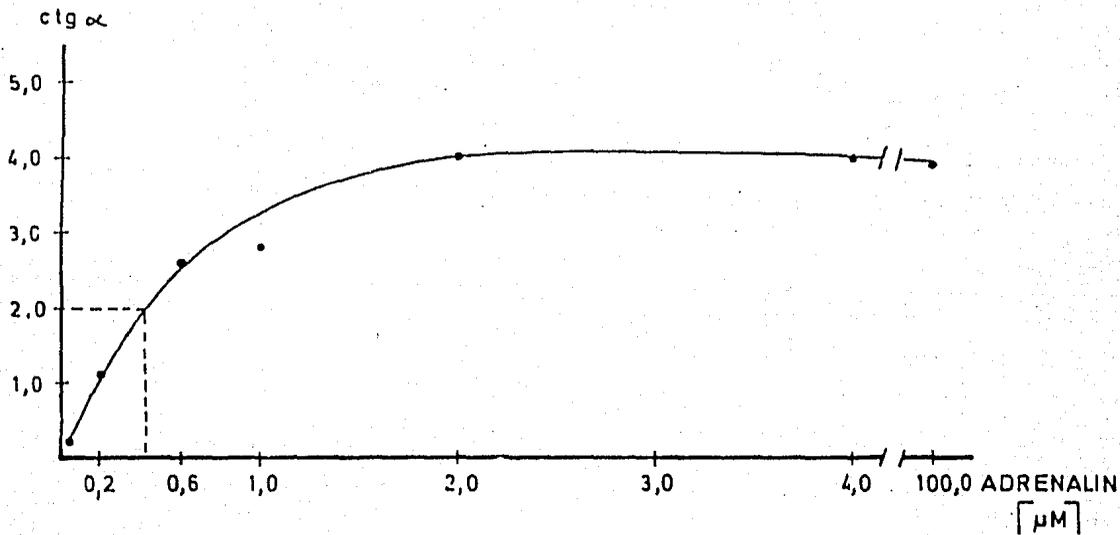


Fig. no. 2. Ejemplo de una curva dosis-efecto de la agregación plaquetaria inducida por adrenalina. Fueron tomados los valores obtenidos por la cotangente alfa, para cada persona (ver nota pág. 12). De la curva se puede leer la dosis media de adrenalina que produce un efecto máximo (línea interrumpida).

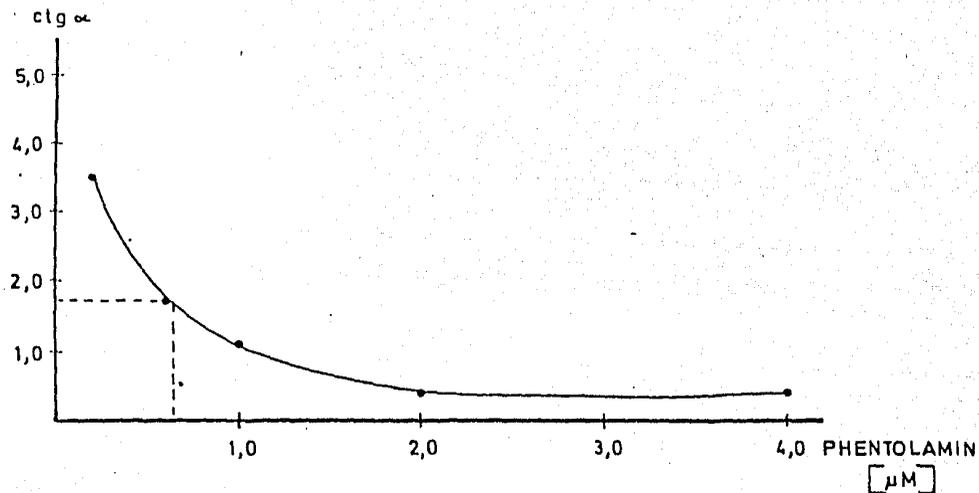


Fig. no. 3. Ejemplo de una curva dosis-efecto de la inhibición por fentolamina de la agregación inducida por adrenalina. Fueron tomados los valores obtenidos, para cada persona, de la cotangente alfa (ver nota pág. 12). De la curva se puede leer la dosis media requerida para producir un efecto máximo inhibitorio (línea interrumpida).

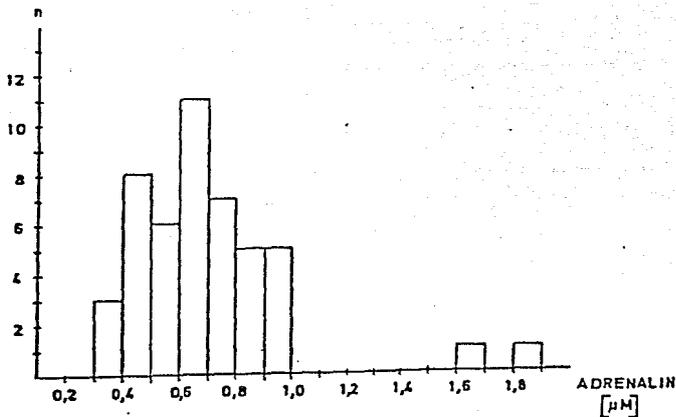


Fig. no. 4. Distribución de la concentración media de adrenalina requerida para producir un efecto máximo en 47 personas.

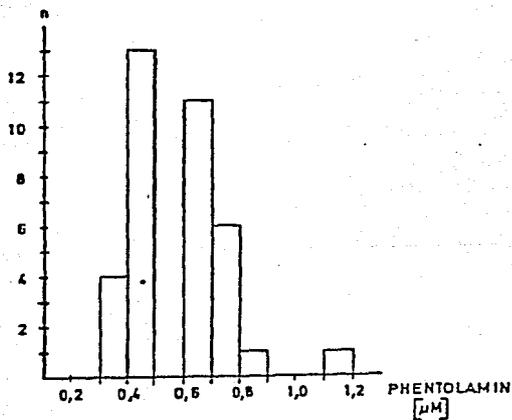


Fig. no. 5. Distribución de la concentración media de fentolemina requerida para inhibir a su máximo la agregación plaquetaria inducida por adrenalina en 46 personas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla no. 1.

Coefficiente de correlación intraclase para el efecto medio de la máxima agregación inducida por adrenalina e inhibida por fentolamina.

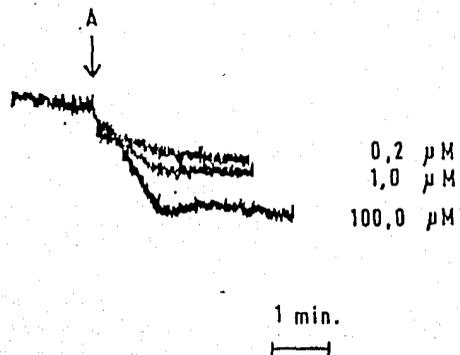
Coefficiente de correlación intraclase.	adrenalina	fentolamina
mediciones repetidas en una sola persona (n = 10)	0.61*	0.70**
Personas sin lazos consanguíneos en el mismo experimento (9 parejas)	0.29	-0.41
MC (17 parejas)	0.65**	0.42*
DC (15 parejas)	0.43	0.67**

MC = gemelos monocigóticos; DC = gemelos dicigóticos

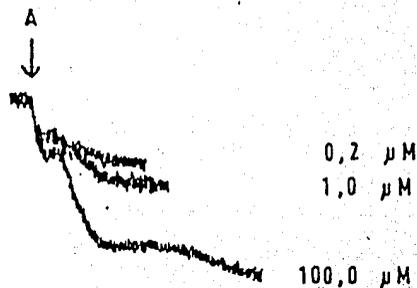
** P 0.01; * P 0.05

agregación completa fué en general de 2μ , no fué posible inducir una segunda fase de agregación. Esto se presentó de manera consistente en experimentos repetidos y fué corregido cuando se agregaban a las muestras la sustancia conocida como ionómero del calcio 1-23187. Este fenómeno guarda una semejanza con el defecto "aspirin like" descrito en la literatura (fig. 5). El hecho de que en los mencionados cuatro sujetos el número de los receptores alfa-adrenérgicos se encontró dentro de lo normal, permite concluir que ésta alteración no se relaciona con la función de los receptores alfa-adrenérgicos en los trombocitos.

Es concebible que en personas con ésta agregación plaquetaria incompleta, el riesgo sea menor para enfermedades del tipo de la apoplejía, en lo que hay una trombolisis producida por elevación de la secreción de adrenalina, puesto que sus plaquetas no se agregan tan fácilmente en presencia de ella. Sería interesante realizar investigaciones en este sentido, entre los hemofílicos de estos voluntarios.



53 / I



53 / II

Fig. no. 6. Curva de agregación de una pareja de gemelos monocigóticos, en los cuales se encontró, de manera concordante, una falta de la segunda fase.

Nota.

Para la medición cuantitativa de la agregación plaquetaria inducida por adrenalina se siguió el proceso: en la primera fase de la curva registrada con la dosis máxima de adrenalina requerida para inducir una agregación, se trazó una línea recta, como lo muestra la siguiente figura, que forma, en relación al papel de registro un ángulo recto. Midiendo el largo de los catetos "a" y "b" se obtiene el valor de la cotangente alfa.

